



**RESPOSTAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE  
MILHO À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS E FONTES DE NITROGÊNIO.**

**CRISTINA MEIRA DE JESUS**

**2014**

**CRISTINA MEIRA DE JESUS**

**RESPOSTA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO À  
INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FONTES DE  
NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. D.Sc. Joilson Silva Ferreira

Co-Orientadora:

Prof<sup>ª</sup>. D.Sc. Vera Lúcia Divan Baldani

VITÓRIA DA CONQUISTA

BAHIA – BRASIL

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
*Área de Concentração em Fitotecnia*

*Campus de Vitória da Conquista – BA*

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título: RESPOSTA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO À  
INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FONTES DE  
NITROGÊNIO**

**Autor: Cristina Meira de Jesus**

**Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE  
EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA,  
pela Banca Examinadora:**

---

**Prof. Joilson Silva Ferreira, D.Sc. – UESB**  
**Presidente**

---

**Prof. Erineudo Lima Canuto, D.Sc. – IFMT**

---

**Prof. Paulo Araquém Ramos Cairo D.Sc. – UESB**

**Data de realização: 24 de Fevereiro de 2014.**

**Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 424 8731 –**

**Faz: (77) 424-1059 – Vitória da Conquista – BA – CEP: 45083900**

**e\_mail: [mestrado.agronomia@uesb.br](mailto:mestrado.agronomia@uesb.br)**

*Aos meus pais,  
Meus irmãos César e Lucinha.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me carregar nos braços e me levantar em todas as quedas, por me ajudar a suportar e retirar todas as pedras que estiveram em meu caminho. Agradeço por cuidar da minha saúde, pois, dessa forma, conseguir finalizar meu trabalho;

À minha mãe, pelo incentivo, amor e confiança, por se esforçar tanto para realização do meu sonho;

Ao meu pai, pelo amor e carinho e que, independente de minha escolha, acredita em meu sucesso;

Aos meus irmãos, César e Lucinha, meus amigos, defensores e protetores, que sempre me apoiam, mesmo estando distantes, sempre souberam me levantar, quando estou triste, com palavras de motivação e amor;

Ao meu amigo e querido orientador, Dr. Joilson Silva Ferreira, pelo apoio incentivo, confiança e carinho, obrigada por me fazer uma pesquisadora melhor, os seus ensinamentos serão carregados pelo resto de minha vida;

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Divan Baldani, pelo apoio, confiança e contribuição na execução deste trabalho;

À minha amiga e irmã de coração, Rayka, que me ajudou muito, foi minha base para conseguir finalizar meu trabalho. Obrigada pelo carinho, apoio e companhia;

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;

À coordenação e aos professores do Programa de Pós- Graduação em Agronomia (Fitotecnia), pela contribuição;

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudo;

À banca examinadora, pela participação e contribuição;

Aos professores, Dr. Otoniel Morais e ao Msc. Divino, pelos laboratórios cedidos para realização das análises agronômicas e pelos conselhos;

Ao Instituto Federal Baiano de Guanambi, em especial, ao Professor Mcs. Leandro Santos, pelo local cedido para análises e apoio nos trabalhos;

À Diretoria de Campo Agropecuário (DICAP), pela colaboração e apoio técnico cedido;

Ao pessoal do campo experimental, pela grandiosa ajuda na condução dos experimentos;

Aos colegas de Pós-graduação, Everardes, Ana Paula, Ubiratan, Eduardo, Gabriela, Aderson, Joelma e Renan, pelo apoio e amizade;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para concretização desta pesquisa.

## RESUMO

DE JESUS, Cristina Meira. **RESPOSTAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FONTES DE NITROGÊNIO.** 90 p. \*(Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista – BA, 2014.

O nitrogênio é um dos principais nutrientes requerido pelas culturas. O uso de fertilização mineral é a forma mais utilizada para suprir a necessidade deste elemento pelas plantas, porém, requer custos e podem colaborar com a poluição ambiental. A associação das plantas de milho com bactérias diazotróficas pode representar uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável para a produção destas plantas em sistemas agrícolas com baixa utilização de insumos. Contudo, a seleção de estirpes bacterianas eficientes, o uso de genótipos responsivos à inoculação, como também a fonte de nitrogênio que será aplicada, são fatores chaves para a obtenção dos benefícios oriundos da fixação biológica de nitrogênio. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes e genótipos de milho eficientes à inoculação, quando submetidas a fontes de nitrogênio diferentes, em Vitória da Conquista – BA. O estudo foi realizado em três experimentos. O primeiro e segundo experimentos foram realizados em casa de vegetação, com a finalidade de selecionar estirpes e genótipos de milho associados à melhor dose de nitrogênio, em resposta a FBN. No terceiro, realizado em vaso a céu aberto, avaliou-se a expressão dos genótipos e estirpes, selecionados sob diferentes fontes de adubos nitrogenados. O primeiro experimento foi conduzido em esquema fatorial 7X3, com 6 bactérias, sendo os isolados nativos J9, J10 e N13, inoculante comercial, ZAE 94 e SP245, cedidas pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ, e 1 controle sem inoculação, com 2 doses de nitrogênio (60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>) e 1 controle sem adubação, dispostos de forma inteiramente casualizada (DIC), com 6 repetições. O segundo experimento realizado em DIC, com 5 repetições, esquema fatorial triplo 7x3x2, sendo 6 bactérias e 1 controle, 2 doses de nitrogênio (60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>) e 2 genótipos de milho, AL bandeirante e AG40151, sendo utilizadas as mesmas bactérias. E no terceiro experimento, os tratamentos distribuídos em DIC, arranjados em esquema fatorial triplo 4x5x2, com 4 repetições, sendo utilizadas as bactérias ZAE 94, J10, o inoculante comercial e 1 controle não inoculado; foi selecionada a dose de 90 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, aplicadas em proporções diferentes de duas fontes de adubos fertilizados, o nitrato de cálcio e sulfato de amônio, sendo feitas as seguintes combinações:  $0\text{NO}_3^-:100\text{NH}_4^+$ ,

25NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:75NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 50NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:50NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 75NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:25NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os parâmetros agronômicos avaliados nos três experimentos foram: alturas de plantas (AP), massa fresca (MF) e massa seca de parte aérea (MSPA). Nos resultados obtidos nos experimentos, pode-se concluir que o isolado J10 demonstrou promissor para uso como insumo biológico; que a variedade AL Bandeirante respondeu positivamente à inoculação e que o balanceamento de íons de nitrato e amônio, submetidos às plantas, favorecem a assimilação e desenvolvimento das mesmas.

**Palavras-chave:** Zea mays L., Dinâmica de nutrientes, cultivar.

---

\*Orientador: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB. Co-orientadora: Vera Lúcia D. Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA

## ABSTRACT

DE JESUS, Cristina Meira. **RESPONSES OF DIFFERENT MAIZE GENOTYPES The injection of bacteria diazotrophic AND SOURCES OF NITROGEN.** 90 p. \*(Master's Degree in Agronomy, Phytotechny). State University of Southwest Bahia – SUSB, Vitoria da Conquista – BA, 2014.

Nitrogen is one of the main nutrients required by crops. The use of mineral fertilizers is the most common form to supply the need of this element by plants, although it requires costs and can contribute to the environmental pollution. The association of corn plants with diazotrophic bacteria may represent an ecologically sustainable and economically viable alternative to the production of these plants in agricultural systems with low use of raw materials. However, the selection of efficient bacterial strains, the use of responsive genotypes to inoculation, as well as the source of nitrogen to be applied, are key factors to obtain the benefits from biological nitrogen fixation. Considering what was stated above, the aim of this work has been to select strains and genotypes efficient inoculation corn, when subjected to different sources of nitrogen in Vitoria da Conquista - BA. The study was carried out in three experiments. The first and second experiments were performed in greenhouse, in order to select corn strains and genotypes associated with best nitrogen dose as requested by the BNF. The third one was carried out in vessel, open air, whose expression of the selected genotypes and strains under different sources of nitrogen fertilizers was evaluated. The first experiment was done in 7X3 factorial scheme with 6 bacteria: the native isolates J9, J10, the commercial inoculant, N13, and ZAE 94 and SP245 provided by Embrapa Seropedic Agrobiology, - RJ and 1 control without inoculation with 2 doses of nitrogen (60 and 90 kg ha<sup>-1</sup>) and 1 control without fertilization, arranged completely at random (DIC), with 6 replicates. The second experiment was performed in DIC with five replications, 7x3x2, triple factorial scheme involving 6 bacteria and 1 control, 2 doses of nitrogen (60 and 90 kg ha<sup>-1</sup>) and two corn genotypes, AL Scout and AG40151. We used the same bacteria. And in the third experiment the treatments were distributed in DIC, arranged in 4x5x2 triple factorial scheme with 4 replications. When the bacteria ZAE 94, J10, the commercial inoculant and the non-inoculated control 1 were used, the dose of 90 kg/ha of nitrogen was selected, applied in different proportions of two sources of fertilized compost: the calcium nitrate and the ammonium sulfate. These following combinations were made: 0NO<sub>3</sub>: 100NH<sub>4</sub> +,

**25NO<sub>3</sub>: 75NH<sub>4</sub> +, 50NO<sub>3</sub>: 50NH<sub>4</sub> + and 75NO<sub>3</sub>: 25NH<sub>4</sub> +. The agronomic parameters which were evaluated in the three experiments were: plant height (PH), fresh mass (FM) and dry mass (MSPA). From the results which were obtained with the experiments we could conclude that isolate J10 showed to be promising to be used as a biological fertilizer; that the variety AL Bandeirante responded positively to inoculation and that the balancing of nitrate and ammonium ions subjected to plants, favor their assimilation and development.**

**Keywords:** *Zea mays* L., Nutrient dynamics, cultivate.

---

\*Orientador: Joilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB. Co-orientadora: Vera Lúcia D. Baldani, *D.Sc.*, EMBRAPA

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Altura (ALT) e massa fresca de parte aérea (MFPA) do milho híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista-BA.....40

Tabela 2 - Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de Altura (ALT) relacionados às médias da tabela 1.....41

Tabela 3 - Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de Massa fresca de parte aérea (MFPA) relacionados às médias da tabela 1.....43

Tabela 4 - Massa seca de parte aérea (MSPA) de milho híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista-BA.....44

Tabela 5 – Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de Massa seca de parte aérea (MSPA) relacionados às médias da tabela 4.....45

Tabela 6 - Altura (ALT) do milho cultivar AL Bandeirante e híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista -BA.....46

Tabela 7 - Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de altura (ALT) relacionados às médias da tabela 6.....47

Tabela 8. Massa fresca de parte aérea (MFPA) do milho cultivar AL Bandeirante e híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.....49

Tabela 9. Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de massa fresca de parte aérea (MFPA) relacionados às médias da tabela 8.....50

Tabela 10 - Massa seca de parte aérea (MSPA) do milho cultivar AL Bandeirante e híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.....51

Tabela 11- Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de massa seca de parte aérea (MSPA) relacionados às médias da tabela 10.....52

Tabela 12- Altura (ALT) do milho variedade AL bandeirante e Híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculantes, cultivados em Vitória da Conquista – BA.....56

Tabela 13- Massa fresca parte aérea (MFPA) do milho variedade AL bandeirante e Híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculantes, cultivados em Vitória da Conquista – BA.....58

Tabela 14 - Massa seca da parte aérea (MSPA) do milho variedade AL bandeirante e Híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculantes, cultivados em Vitória da Conquista – BA.....61

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

°S - Latitude Sul

°W - Latitude Oeste

ALT - altura

Assistat - Assistência Estatística

atm - atmosfera

BA - Bahia

BPCPs - Bactérias promotoras do crescimento de plantas

Cmol<sub>c</sub> dm<sup>3</sup> - Centimol de carga por decímetro cúbico

FBN - Fixação biológica de nitrogênio

g dm<sup>3</sup> - grama por decímetro cúbico

ha - Hectare

Kg - Quilogramas

Kg.ha<sup>-1</sup> - Quilogramas por Hectare

MFPA - massa fresca de parte aérea

mg dm<sup>3</sup> - miligrama por decímetro cúbico

MSPA - Matéria Seca da Parte Aérea

N - Nitrogênio

N<sub>2</sub> - Nitrogênio

NH<sub>3</sub> - amônia

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - amônio

UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

## SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2-REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
<b>2.1 - Cultura do milho</b> .....	20
<b>2.2 Nitrogênio</b> .....	22
<b>2.3 Fixação Biológica de nitrogênio</b> .....	27
<b>2.4 Bactérias Diazotróficas</b> .....	28
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>3.1 Descrição da área experimental</b> .....	34
<b>3.2 Descrição das bactérias diazotróficas utilizadas</b> .....	34
<b>3.3 Inoculação</b> .....	35
<b>3.4 Descrição dos genótipos de milho utilizados</b> .....	36
<b>3.4.1 AG 1051</b> .....	36
<b>3.4.2 AG 4051</b> .....	37
<b>3.4.3 AL Bandeirante</b> .....	37
<b>3.5 Análise estatística</b> .....	38

<b>3.6 EXPERIMENTO I: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio. ....</b>	<b>38</b>
3.6.1 <i>Delineamento experimental</i> .....	38
3.6.2 <i>Semeadura e adubação</i> .....	39
3.6.3 <i>Variáveis analisadas nos experimentos</i> .....	39
3.6.3.1 <i>Altura de plantas</i> .....	39
3.6.3.2 <i>Acúmulo de massa fresca e seca de parte aérea</i> .....	40
<b>3.7 EXPERIMENTO II: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio. ....</b>	<b>40</b>
3.7.1 <i>Delineamento experimental</i> .....	40
3.7.2 <i>Semeadura e adubação</i> .....	40
<b>3.8 EXPERIMENTO III: Avaliar respostas dos genótipos de milho a fontes e proporções diferentes de nitrogênio associada à inoculação com bactérias diazotróficas. ....</b>	<b>41</b>
3.8.1 <i>Delineamento experimental</i> .....	41
3.8.2 <i>Semeadura e adubação</i> .....	41
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Experimento I: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio. ....</b>	<b>43</b>

<b>4.2 Experimento II: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio. ....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Experimento III: Avaliar respostas dos genótipos de milho a fontes e proporções diferentes de nitrogênio associada à inoculação com bactérias diazotróficas. ....</b>	<b>57</b>
<b>5 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1-INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância econômica e mais estudada devido ao valor nutricional de seus grãos, dada sua grande importância na alimentação humana, animal e matérias-primas para a indústria.

O uso do milho em grão para alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que, no Brasil, varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano (DUARTE e outros, 2010).

Em decorrência da crescente demanda, há a necessidade do aumento da produção da cultura. Dentre os fatores limitantes para alta produtividade na cultura do milho, o nitrogênio (N) é considerado um dos principais nutrientes (FERNANDES, 2006).

Ainda que 78% da atmosfera seja constituída por nitrogênio gasoso, ele é um dos elementos de maior limitação para a manutenção de qualquer forma de vida no planeta, visto que a maior parte dos seres vivos não tem acesso a este reservatório.

A disponibilização deste elemento à biosfera pode ocorrer por meio de descargas elétricas, industrial e biológica. Porém, a forma disponível de N para as plantas só ocorre com a quebra da tripla ligação dos dois átomos de N, que leva à redução do  $N_2$  à amônia ( $NH_3$ ), o que requer um grande gasto energético, principalmente pelo processo industrial.

Em contraste às condições empregadas no processo industrial de Haber-Boch, a fixação biológica consegue fazer o mesmo processo em condições amenas (20°C, 0,8 atm, potencial redox de 500 mV), o que estimulam a busca de agentes biológicos que catalisam e fixam o nitrogênio (FRYZUK, 2000).

Na agricultura, grande parte dos fertilizantes nitrogenados utilizados é solúvel em água, dessa forma, o nitrogênio encontra-se prontamente disponível às plantas. As eficiências deles se assemelham, mas se diferenciam em relação aos mecanismos de perdas, presença ou interação com outros nutrientes, ou condições de baixo pH do solo (MAÇÃS, 2008).

As principais fontes de absorção de nitrogênio pelas plantas são os íons  $\text{NH}_4^+$  e o  $\text{NO}_3^-$ . Sua aplicação de forma desbalanceada pode causar alterações no desenvolvimento e crescimento vegetal. A preferência das culturas na absorção destes íons varia entre elas, em algumas, a forma  $\text{NH}_4^+$  é a mais desejável, já que pode ser utilizada diretamente na síntese de aminas e aminoácidos, porém, as plantas são mais hábeis em absorver  $\text{NO}_3^-$ .

As fontes de nitrogênio mais utilizadas para disponibilização destes íons no solo são feitas através da fertilização nitrogenada, o que tem garantido a produtividade da maioria das plantas cultivadas, no entanto, o uso excessivo destes fertilizantes representa riscos de contaminação ambiental e aumento nos custos de produção.

Visando uma produção de forma sustentável, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem sido bastante estudada e utilizada em culturas de valor econômico e social, pois, além dos fertilizantes serem caros e contaminantes de solos e rios, o nitrogênio presente neste não é totalmente aproveitado pelas plantas, em razão de ser um elemento que sofre diversos tipos de transformações, podendo ter perdas irreversíveis.

No processo da FBN, bactérias diazotróficas por ação da enzima nitrogenase quebram a tripla ligação covalente entre os dois átomos de

nitrogênio atmosférico, reduzindo a forma de amônia, em condições ambientes (REIS e outros, 2005). O uso dessas bactérias pode reduzir significativamente a dependência da aplicação de fertilizantes (CONCEIÇÃO e outros, 2009).

O uso de cultivares de milho adaptados a ambientes pobres em nitrogênio e capazes de se associar às bactérias diazotróficas, como também a fonte de nitrogênio a ser utilizada tem sido bastante estudada como uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável para a produção da cultura em sistemas agrícolas com baixa utilização de insumos.

Ainda, visando à forma estrutural e capacidade de absorção das raízes das plantas, as *Poaceas* (antigas gramíneas) possuem uma elevada capacidade para absorção de nutrientes, principalmente de nitrogênio, devido ao seu sistema radicular fasciculado, sendo uma estratégia na reciclagem deste (PERIN e outros, 2004), pois, do nitrogênio que é adicionado ao solo pouco é recuperado pelas plantas.

Portanto, na busca da produção da cultura de milho, de forma sustentável e econômica, a utilização de insumos biológicos, à base de bactérias diazotróficas, é importante para região do sudoeste da Bahia, pois é cultivado principalmente por agricultores familiares, que usufruem de baixo nível tecnológico na lavoura, como também, dispõe de pequenas áreas para cultivo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi de selecionar estirpes e genótipos de milho eficientes à inoculação, quando submetidas a fontes de nitrogênio diferentes, em Vitória da Conquista – BA.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Cultura do Milho

Uma gramínea que pertence à família das *Poaceas*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L., está na classificação taxonômica do milho (LIMA, 2007). Ela apresenta altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz, já que utilizam o ciclo fotossintético  $C_4$ , o que efetiva a sua eficiência na conversão de  $CO_2$  (GOMES, 2009).

Várias hipóteses são levantadas sobre a origem da espécie, a que possui maior confiabilidade é a de que o milho seja descendente do teosinte, que é uma gramínea com várias espigas, sem sabugo e que faz cruzamento natural com milho, resultando em descendentes férteis (FREITAS, 2001).

É uma cultura tropical, o clima quente é favorável para que possa expressar seu potencial produtivo, desenvolve-se bem em dias curtos e com altas taxas fotossintéticas, portanto, é uma boa alternativa de cultivo para agricultores (EVANGELISTA e outros, 2005).

A área plantada com a cultura no Brasil, entre safra e safrinha, é de 14 milhões de hectares; é uma das principais fontes de alimento para criações, principalmente suínos e aves, seja por meio de ração ou silagem. Para consumo humano, utilizam-se os grãos úmidos e sua matéria prima é utilizada pelas indústrias para produção de óleos, cola, álcool bebida e demais produtos (CONAB, 2012).

Dentre os grandes produtores da cultura de milho no mundo, destaca-se os Estados Unidos e China, em terceiro lugar, o Brasil. No país, a produção agrícola é amplamente difundida, havendo diferenças de região para região, dando destaque às regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste que, diante do cenário

nacional, destacam-se como a segunda maior área cultivada de milho, perdendo apenas para soja, o que representa 90% da produção do país (CONAB, 2013).

Avaliando a produtividade nos grandes centros de cereais, leguminosas e oleaginosas, os valores percentuais obtidos nestas seguem com o Centro-Oeste, produzindo 75,8 milhões de toneladas; a região Sul com 73,3 milhões de toneladas, o Sudeste com 19,5 milhões de toneladas, o Nordeste com 12,8 milhões de toneladas e o Norte obtendo 4,5 milhões de toneladas. Dentre as regiões avaliadas, o Sul destaca-se, obtendo o maior incremento comparado à safra passada, no valor de 32,7%, já as do Centro Oeste, com 7,9%; o sudeste, 1,2%; e o Nordeste em segundo, com 8,2% (IBGE, 2013).

Com a produção de 2.174,3 toneladas, a Bahia se destaca como região de maior produção do Nordeste (CONAB, 2012). Na Bahia, a produção de milho está concentrada em duas regiões, o oeste considerado como referência na produção de cereal, sendo consolidada desde a época de 90, no estado. A outra região é o nordeste do estado, que vem se destacando nos últimos anos, por alcançar índices de produtividades. Em 2013, a produção do milho aumentou para 13,97% em relação a 2012, no qual de 1,88 milhões de toneladas passou para 2,15 milhões de toneladas (SEAGRI, 2013).

Ao longo do ciclo da cultura do milho, há uma alta demanda por nitrogênio requerida, o que acarreta em um dos principais aspectos que definem o impacto da adubação em sua produtividade (HURTADO e outros 2010).

O adubo nitrogenado, dentre os fertilizantes usados na cultura, é o que mais eleva o custo da adubação, podendo representar em torno de 40% do custo total de produção. Dessa forma, uma alternativa relevante no suprimento deste elemento é a fixação biológica de nitrogênio (CIRIGIOLI, 2005). Além disso, a seleção de genótipos de plantas responsivos à FBN é de suma importância para reduzir o uso de adubos nitrogenados em várias culturas de valor econômico (URQUIAGA e outros, 1992; BALDANI e outros, 1997; REIS e outros, 2000).

Identificar e selecionar genótipos de milho eficientes na aquisição de nitrogênio e na tolerância a sua deficiência são estratégias importantes, como também, a busca por genótipos que associem de forma eficiente com bactérias diazotróficas e ou promotoras de crescimento (JUNIOR e outros, 2008).

## **2.2 Nitrogênio**

O nitrogênio é um dos principais nutrientes requeridos, o qual tem efeito expressivo no aumento da produção de grãos. Ele é constituinte de moléculas de proteínas, enzimas, coenzimas, ácido nucleico e citocromos, além de sua importante função como integrante da molécula de clorofila (GROSS e outros, 2006).

Nos estádios iniciais do milho, com 4-5 folhas expandidas, época em que se define o potencial produtivo, é relevante observar possíveis deficiências de nitrogênio (RITCHIE e outros, 2003). Do mesmo modo que uma boa disponibilização de N é fundamental para o melhor desenvolvimento das plantas de milho em área foliar e produção de matéria seca, como também, na produtividade (OLIVEIRA e outros, 2009).

Na prática, determinar a quantidade de N requerida para o cultivo de milho não é tarefa simples, em razão das diversas reações das quais o nutriente participa no solo (STOCKDALE e outros 1997; AMADO e outros, 2002; CANTARELLA & DUARTE, 2004) .

De acordo com Maçãs (2008), o N é um dos nutrientes que mais limita o desenvolvimento, a produtividade e a biomassa da maioria das culturas, cujas principais fontes deste elemento, na agricultura, são os fertilizantes derivados da amônia anidra, como a ureia, o sulfato de amônio e o nitrato de amônio.

Misra & Dwivedi (1990) relatam que as respostas das plantas em função do crescimento variam dependendo da adubação nitrogenada, da fonte de

nitrogênio fornecida (nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ )), salinidade e da espécie em que se está trabalhando. Estes dados foram obtidos avaliando diferentes fontes de N em função do acúmulo de matéria seca no caule, quando submetido a níveis críticos de salinidade, na qual verificaram-se maiores reduções, quando se usou a ureia (56,1%) e sulfato de amônio (55,4%); já com o uso do nitrato de cálcio, a redução foi menor, de 36,36%.

Lourene & outros (2007), trabalhando com diferentes fontes de nitrogênio no milho, também relataram diferenças no número de grãos por espiga e no teor de nitrogênio foliar.

Solos adubados com amônio, em condições aeróbicas e altas temperaturas, oxidam para nitrato em intervalo de 15 a 30 dias, sendo assim, a forma de aporte de nitrogênio a curto prazo será o nitrato (CANTARELLA, 2007).

O amônio pode ser incorporado em glutamina, através da enzima glutamina sintetase, armazenado no vacúolo e ser transportado por carregadores específicos (CRAWFORD & FORDE, 2002).

Tais carregadores específicos são responsáveis pela absorção de N, através da membrana plasmática, sendo o de baixa afinidade (low affinity transport system – LATS) e de alta afinidade (high affinity transport system – HATS) (ASLAM e outros, 1992; LEA, 1993; VONWIRÉN e outros, 1997)

O LATS é constitutivo, não sofrem regulação e são ativados em concentrações externas de  $1\text{mmol L}^{-1}$  e de  $0,5\text{mmol L}^{-1}$  de amônio e nitrato, respectivamente. Porém, o HATS só será ativado quando as concentrações externas destes elementos forem inferiores a do LATS, outra diferença é o fato de poderem ser constitutivos (Constitutive high affinity transport systems – CHATS) ou serem induzidos (Induced high affinity transport systems – IHATS) na presença de N (ASLAM e outros, 1992; LEA, 1993; VONWIRÉN e outros, 1997).

As formas de disponibilização do nitrato e amônio podem ocorrer através da mineralização, nitrificação e fixação biológica. Como relatado, segundo Marengo & Lopes (2009), o nitrato pode originar-se através de transformações bioquímicas de aminoácidos nitrogenados (mineralização), como também pela incorporação de adubos. Já o amônio será disponibilizado pelo processo de nitrificação, via fixação biológica de N, em leguminosas ou da adubação mineral (SILVA e outros, 2009).

Bactérias do gênero *Nitrossomonas* sp., em solos bem drenados, convertem as formas de N absorvidas pela planta em nitrito que, por ação das Bactérias do gênero *Nitrobacter* sp., passa a nitrato, no qual será absorvido pelas plantas; esse processo é denominado de nitrificação. Porém, em solos inundados ou bem drenados com sítios de maior umidade, a menor quantidade de oxigênio favorece o processo de desnitrificação, no qual algumas espécies de bactérias utilizam, na sua respiração, o nitrato ao invés do oxigênio, o que proporciona perdas de nitrogênio para a atmosfera na forma de óxido nitroso (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010).

A mineralização do N orgânico presente na matéria orgânica é responsável pela disponibilidade de N no solo, quando não fertilizados, sendo este processo realizado por microrganismos que transformam o N orgânico nas formas minerais ( $\text{NH}_4^+$ ) e ( $\text{NO}_3^-$ ), absorvidas pelas plantas (DUARTE, 2007). O uso da adubação nitrogenada (química ou orgânica) é necessária para complementar a quantidade de N fornecida pelo solo, já que o milho requer grandes quantidades para seu desenvolvimento. No entanto, a dependência da concentração mineral deste no solo e suas perdas pelo processo de lixiviação podem reduzir a eficiência da utilização deste mineral disponível no adubo (FIGUEIREDO e outros, 2005).

O nitrogênio aplicado via fertilizantes minerais e adubos verdes pode ser perdido no sistema solo – planta por lixiviação, volatilização, erosão e

desnitrificação, e a outra é absorvida pelas plantas (LARA CABEZAS e outros, 2000).

O adubo nitrogenado mais utilizado na agricultura é a ureia, porém, quando aplicada ao solo, sofre hidrólise enzimática, formando amônia que será rapidamente perdida por volatilização pela atmosfera (DA ROS; AITA; GIACOMINI, 2005).

O uso apenas do amônio como fonte de N pode corroborar com a redução do acúmulo de matéria seca das plantas (BARBER & PIERZYNSKY, 1993). Ainda que o excesso de amônio absorvido leva à toxicidade da planta, o que pode anular sua vantagem em termos de custos energéticos e este fator pode provocar a redução da matéria seca (GIVAN, 1979; RAAB & TERRY, 1995; GUO e outros, 2002).

A distribuição de carboidratos nas plantas pode ser um indicador na sensibilidade ao amônio, visto que, parte destes é desviada para as raízes para assimilação, o que provoca a redução de matéria seca na relação raiz: parte aérea (CRAMER & LEWIS, 1993). Logo, com o adequado suprimento de carboidratos, a assimilação de amônio será mais rápida, evitando o acúmulo do mesmo na parte aérea e a morte das plantas (SCHJOERING e outros 2002).

Em estudos com a cultura do trigo, avaliando o efeito do amônio na relação raiz:parte aérea, as raízes manifestaram maior sensibilidades ao amônio do que a parte aérea, contudo, os mesmos resultados não foram observados no milho (LEWIS e outros, 1989).

Em estudo com espécies de origem tropical, a redução do  $\text{NO}_3^-$ , independente da sua concentração, ocorre de forma preferencial na parte aérea. Ele pode ser reduzido ou armazenado nas raízes ou transportado para a parte aérea e reduzido nas folhas, o local na qual vai ocorrer a redução varia entre as espécies de plantas e sua taxa de absorção (NAMBIAR e outros 1988).

Tisdale e outros (2005) relatam que plantas, quando nutridas com nitrato e amônio, promovem um melhor crescimento vegetal, quando se compara ao suprimento destas apenas com amônio ou nitrato. Similarmente, trabalhando com três cultivares de couve chinesa (*Brassica chinensis* L.), Chen e outros (2005), em solução hidropônica com três relações de amônio: nitrato (0:100,25:75 e 50:50), observaram que o melhor crescimento do couve ocorre quando se aplica a proporção de 25:75 de amônio e nitrato, respectivamente.

Além disso, Duan e outros (2007) também ressalva que a nutrição parcial de nitrato melhora o desenvolvimento do arroz (*Oryza sativa*), mesmo que a planta prefira o amônio ao invés do nitrato. Tisdale e outros (2005) também relatam que o amônio é a forma preferencial das plantas, já que, para assimilação, requer menor gasto energético, visto que o nitrato necessita ainda ser reduzido para que, posteriormente, possa estar disponibilizando nitrogênio para planta.

Além disso, as vantagens de custo energético, quando a forma assimilada pela planta é o amônio  $\text{NH}_4^+$ , corroborou com a criação de programas de seleção de linhagens de milho (*Zea mays*), com maior eficiência na utilização de amônio (ALCANTARA, 2009).

O uso de inibidores de nitrificação testados em solo, a atividade da enzima sintetase de glutamina no tecido da planta e a preocupação do menor acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  livre no tecido são fatores relevantes, quando se quer selecionar genótipos de milho (MAGALHÃES e outros, 1993; MAGALHÃES & MACHADO, 1995).

Deste modo, identificar e selecionar genótipos de milho que sejam mais propícios a tolerar a falta de nitrogênio e que sejam eficientes na incorporação do mesmo é um fator importante, da mesma forma que o estudo para que se encontrem genótipos que se associem com bactérias que promovem o crescimento da planta, tais como as diazotróficas, já que elas interagem com o

nitrogênio, disponibilizando na forma assimilável para as plantas (JUNIOR e outros, 2008).

Por outro lado, vale ressaltar que o uso de fertilizante nitrogenado é uma prática que eleva os custos de produção e gera dano ao ambiente, e ainda, grande parte do fertilizante aplicado é perdido (CHAVARRIA & MELLO, 2011). No entanto, o nitrogênio fornecido através da Fixação Biológica é menos propício a ser perdido por processos de lixiviação e volatilização, já que ele é utilizado *in situ*. Deste modo, a FBN proporciona uma agricultura mais barato, limpa e sustentável para o fornecimento de N (HUERGO, 2006).

### **2.3 Fixação Biológica de nitrogênio**

A agricultura moderna visa ao aumento da produção das culturas de forma sustentável sem degradar o ambiente. Portanto, uma das alternativas viáveis é a utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal, através de dois mecanismos, direto e indireto. Os diretos, tais como a fixação do nitrogênio, produção de fitohormônios; e os indiretos, que proporcionam antagonismo da planta em relação a patógenos (SILVEIRA, 2001).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é feita por bactérias denominadas diazotróficas, que podem se associar ou não aos vegetais, elas conseguem fixar o N do ar através do complexo enzimático nitrogenase, uma metaloenzima, que irá atuar na conversão de  $N_2$  a  $NH_3$ , em condições de temperatura e pressão ambiente, utilizando como fonte de energia a adenosina trifosfato (ATP) (REIS e outros, 2006).

Para atender essa grande quantidade de ATP para obtenção de energia, é necessário que estejam disponíveis fontes de carbono para uso da bactéria, sendo este um fator de limitação para a fixação biológica do nitrogênio em sistemas não simbióticos. Contudo, os diazotróficos tentam compensar essa limitação

localizando-se na planta de forma endofítica dentro das raízes ou em torno destas (TILAK et al, 2005). Ainda, Reis e outros (2006) relatam que a FBN é caracterizada como um dos processos metabólicos de maior gasto energético celular, pois transfere 8 elétrons e hidrolisa 16 ATP por molécula de N<sub>2</sub> fixado (REIS e outros, 2006).

As bactérias diazotróficas possuem diferentes nichos de colonização associados às plantas, sendo encontradas na rizosfera, rizoplano e endosfera (ZIMMER, 2012). Ocupam sítios onde a concentração de O<sub>2</sub> é limitada e igualada à taxa de respiração, dessa forma, não irá acumular o elemento suficiente para que possa inativar a nitrogenase (DOBEREINER e outros, 1995).

#### **2.4 Bactérias Diazotróficas**

As bactérias diazotróficas compreendem ampla gama de microrganismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas, que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As bactérias diazotróficas, sejam em simbiose ou vida livre, expressam um grande potencial em reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Espécies de grande importância econômica, como cereais, cana-de-açúcar, palmeiras, gramíneas forrageiras e frutíferas, têm sido associadas com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (REIS e outros, 2000).

Há relatos também de ocorrência destas bactérias em solos contaminados com metais pesados, em solos tratados com resíduos siderúrgicos e biossólido industrial (MELLONI e outros, 2000), em áreas sob reabilitação de

bauxita (MELLONI e outros, 2004) e em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (SILVA, 2005).

O Brasil é um dos pioneiros no uso de inoculantes biológicos em vegetais, sendo considerado um dos métodos mais eficientes de adubação disponível no mercado agrícola (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Também chamados de biofertilizantes, são constituídos por bactérias diazotróficas, as quais contribuem para o crescimento e desenvolvimento de diversas culturas e, consequentemente, no aumento da produção agrícola (YANNI, 1997).

Além disso, o uso destes biofertilizantes pode diminuir, ou até mesmo solucionar o impacto ambiental causado no campo e nos lençóis freáticos, provocados pelo uso excessivo de adubo nitrogenado industrial (GRAY & SMITH, 2005).

As plantas de milho podem ser colonizadas por uma grande diversidade de bactérias diazotróficas (CHELIUS & TRIPLETT, 2001). As bactérias podem ser classificadas como promotoras de crescimento de plantas (BPCPs). Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), elas estimulam o desenvolvimento de raízes nos primeiros estádios de crescimento da planta, sendo um impacto positivo da inoculação. No entanto, pesquisas relatam que a inoculação não substitui a adubação nitrogenada, mas promove a melhor absorção e utilização do N disponível (SALA e outros, 2007)

Segundo Bashan & De-Bashan (2005), as bactérias promotoras de crescimento podem influenciar as plantas de forma direta e indireta. A primeira irá fornecer substâncias que, normalmente, estariam pouco disponível às plantas através da fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, ferro e na produção de hormônios como citocininas, giberelinas, auxinas e etileno. E a forma indireta irá atuar no biocontrole de patógenos, permitindo que a planta expresse seu potencial de crescimento, caso patógeno esteja presente.

Dentre as bactérias diazotróficas endofíticas, destacam-se os gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (BALDANI e outros, 2002). Elas podem entrar na planta através de aberturas naturais (estômatos) ou artificiais (ferimentos) (BASHAN & DE-BASHAN, 2005) e colonizarem as plantas aderindo-se à superfície das raízes e, através de lipolisacarídeos, expolisacarídeos bacterianos, penetram a epiderme, ocupando os espaços intercelulares, em seguida, colonizam o xilema e parte aérea das plantas (MONTEIRO e outros, 2012).

Entre as bactérias diazotróficas, destacam-se as espécies de *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiela*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Acetobacter* e a família *Rhizobiaceae*. A maioria tem sido observada em associação com plantas de arroz, milho, sorgo, trigo, soja, feijão, tomate, algodão e cana-de-açúcar (DI CELLO e outros, 1997; BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997; BALDANI e outros, 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; HALLMANN e outros, 1997; BALDANI e outros, 2000).

Bactérias da espécie *H. seropedicae*, associadas a raízes de arroz, milho e sorgo, foram isoladas no Brasil por Baldani e outros (1986); é um gênero bastante estudado entre as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR), sendo mais restrita do que as demais, já que apresentam baixa sobrevivência em solo sem cultivo. Ainda foram encontradas colonizando raízes de trigo, como uma bactéria endofítica (SALA e outros, 2005).

A *H. seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio, aeróbica, móvel, vibrioide, gram-negativa, possui forma de bastão e coloniza os tecidos de diversas plantas, principalmente da família das *Poaceas* (gramíneas) e, ao se associar às plantas, não produz sintomas de doenças. A colonização destes diazotróficos nas plantas é por meio de rupturas no tecido radicular, pontos de emergências das raízes laterais, como também através da sobrevivência destes

no aerênquima e xilema das raízes, sendo encontrada em caules e folhas (JAMES e outros, 2002).

As espécies *H. seropedicae* (BALDANI e outros, 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI e outros, 1996a), *H. frinsigense* (KIRCHHOF e outros, 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE e outros, 2003), *H. clorofephenolicum*, *H. huttiense*, subsp. *putei* (DING E YOKOTA, 2004) e *H. hiltneri* (ROTHBALLER e outros, 2006), *H. rhizosphaerae* (JUNG e outros, 2007), *H. autotrophicum* e *H. aquaticum* (DOBRITSA e outros, 2010) são as dez identificadas do gênero.

O uso de inoculantes para gramíneas podem ser uma fonte de nitrogênio eficiente na substituição parcial de fertilizantes nitrogenados no cultivo de milho e outros cereais, já que podem proporcionar o acréscimo de 20 a 30% na aquisição de N em milho (MOREIRA e outros, 2010). Estes resultados corroboram com a contribuição das PGPR em fornecer N para o metabolismo e crescimento de plantas.

Em estudos avaliando a sobrevivência de bactérias diazotróficas em dois inoculantes à base de turfa, verificou-se o aumento em até 13% na produtividade de grãos e 19% do N-total, em variedades de arroz IAC4440, quando inoculadas com a estirpe ZAE94 da espécie *H. seropedicae*. Alves (2007) também obteve resultados expressivos sobre o desenvolvimento da cultura do milho, trabalhando com a inoculação da mesma espécie.

Guimarães e outros (2010), utilizando a mesma estirpe, e, com aplicação de 50 kg N ha<sup>-1</sup> de adubação nitrogenada, relataram o incremento de 64% no acúmulo de nitrogênio nos grãos em plantas de arroz, quando comparadas ao controle não inoculado e sem adubação.

Resultados satisfatórios em relação ao acúmulo de matéria seca em gramíneas são relatados com uso dessas bactérias, por exemplo, Viana (2012), trabalhando com plantas de arroz cultivar BRS Tropical, obteve maior acúmulo

de massa seca, quando inoculadas com *H. seropedicae* ZAE94 e suplementadas com fertilizante nitrogenado.

O gênero *Azospirillum* tem sido encontrado na rizosfera de várias gramíneas, que é um organismo aeróbico capaz de fixar nitrogênio atmosférico (KENNEDY e outros, 1997). Sua colonização nas raízes de gramíneas tende a uma especificidade entre planta hospedeira e bactéria. Kim e outros (2005) relatam que as espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* têm sido isoladas tanto das raízes como das folhas de arroz, milho e trigo, e *A. amazonense* são mais frequente nas raízes de cana-de-açúcar (OLIVEIRA e outros, 2002).

Bárbaro e outros (2008) também observaram o aumento na taxa de matéria seca do milho, quando inoculados com *Azospirillum brasilense* e associados à fertilização nitrogenada.

Além disso, também foram observados resultados satisfatórios com inoculação de *Azospirillum brasilense*, estirpe Sp245, em variedade de trigo BRS 296, acrescidos com dose de 40 Kg N ha<sup>-1</sup>, por Ferreira e outros (2010), que obtiveram aumento médio de 23,2% de N-Total da parte aérea em relação ao controle sem inoculação.

O gênero *Burkholderia* também tem sido apontado como de ampla ocorrência em associação com o milho cultivado no Brasil e no México (PERIN e outros, 2006), sendo a *B. tropica* detectada com maior frequência. Sendo a primeira espécie descrita do gênero, foi isolada da rizosfera de planta de arroz, no Vietnã, sendo denominadas de *B. vietnamiensis* (GILLIS e outros, 1995).

Resultados positivos à fixação biológica de nitrogênio com o gênero *Burkholderia* nas culturas têm sido demonstrados. Em plantas de arroz, por exemplo, a inoculação de *B. brasilensis* contribuiu com 31% de nitrogênio total na planta, aumentando em 69% sua biomassa (BALDANI e outros, 2000), este resultado também foi relatado em plantas de bananeiras (WEBER e outros, 2000).

Em muitos casos, são relatados que a ausência de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas tem sido atribuída ao uso de linhagens inadequadas (REIS e outros, 2000).

Contudo, há consenso de que o genótipo da planta é o fator-chave para a obtenção dos benefícios oriundos da FBN, aliado à seleção de estirpes eficientes. Como ocorreu em trabalho realizado por Moraes e outros (2012), utilizando determinados genótipos de capim-elefante, os quais constataram altos valores de N fixado entre 36 e 132 Kg N há<sup>-1</sup>, através da FBN.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Descrição da área experimental**

Os trabalhos foram desenvolvidos em casa de vegetação, na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), em Vitória da Conquista, município localizado a Latitude 14°51' S, Longitude 40°50' W e altitude de 941 metros, situado na região sudoeste do estado da Bahia. A classificação de Koppen, para região é AW, com clima variando de subúmido a semiárido. A temperatura média anual varia entre 19,5 a 20,5°C com temperaturas mínimas entre 9°C a 15°C, no mês de julho, e máxima oscilando no mês de janeiro entre 22 a 30°C. A média anual da umidade relativa do ar variando de 70 a 85% (SANTOS, 2011).

Para realização dos experimentos, o solo foi coletado na área experimental da UESB, proveniente do horizonte A de um Latossolo Amarelo típico, profundidade 0-20 cm. A análise física em relação à classe textural foi classificada como Argila Arenosa, e com relação à composição granulométrica, apresentaram os seguintes valores, 445 g Kg<sup>-1</sup> de areia grossa, 115 g Kg<sup>-1</sup> de areia fina, 50 g kg<sup>-1</sup> de silte e 380g kg<sup>-1</sup>.

A análise química deste solo apresentou os seguintes resultados: pH em água = 4,2; P = 2 mg dm<sup>-3</sup>; K = 0,10 Cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; M.O = 22 g dm<sup>-3</sup>. Para as correções do solo, foram seguidas as recomendações segundo a Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (ALVAREZ & RIBEIRO, 1999).

#### **3.2 Descrição das bactérias diazotróficas utilizadas**

Estirpes utilizadas nos tratamentos:

- ✓ BR 11417 (ZAE 94) - Isolada de raízes desinfestadas de plantas de arroz por Baldani e outros (1986), é uma estirpe que pertence à espécie *Herbaspirillum seropedicae*, pertencente à coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia;
- ✓ BR 11005 (SP 245) – *Azospirillum brasilense*, pertencente à coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia;
- ✓ J9 e J10 - São estirpes isoladas de raízes de milho por Santos (2013), na região de Vitória da Conquista – BA, provavelmente pertencente à espécie *Herbaspirillum sp.*;
- ✓ N13 – É uma estirpe que provavelmente pertence à espécie *Azospirillum sp.*, que também foram isoladas de raízes de milho por Santos (2013), na região de Vitória da Conquista – BA;
- ✓ MASTERFIX – Inoculante comercial para gramíneas com as estirpes AbV5 e AbV6 de *Azospirillum brasilense* (Stoller).

### **3.3 Inoculação**

Para o primeiro experimento em casa de vegetação, foi feito o preparo do inoculante descrito a seguir, posteriormente, o mesmo foi utilizado nos demais experimentos.

As estirpes foram colocadas para crescer em meio líquido. Posteriormente, utilizou 75 mL da suspensão bacteriana das estirpes ZAE 94, SP245, J9, J10 e N13, nas quais foram inoculadas em saquinhos de polipropileno contendo 175 g de turfa, preparada de acordo com Stralio

(2000), sendo maturada por um período de 24 horas, a 30°C, em estufa. Após o preparo do inoculante, as sementes foram umidificadas com água destilada para melhorar a aderência do inoculante à semente. A quantidade de inoculante foi aplicada na proporção de 250g de inoculante para 10kg de sementes de milho (ALVES, 2007).

Para os cálculos dos números mais prováveis (NMP) de bactérias diazotróficas, foram feitas a triplicata de  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  em meio semissólido JNFB para *Herbaspirillum* e NFB para *Azospirillum*. Após o crescimento e, realizada a contagem, utilizou-se a tabela de McCrady, para estimativa do número de bactérias (DOBEREINER, 1995). Os valores obtidos foram de aproximadamente 109 cel. mL<sup>-1</sup>.

Já a dosagem do inoculante comercial Masterfix Gramíneas®, a quantidade recomendada do produto é de 100mL ha<sup>-1</sup>. Sendo que foram inoculadas duas horas antes do plantio, de forma que evitasse possíveis contaminações ou diminuição da população bacteriana.

### **3.4 Descrição dos genótipos de milho utilizados**

#### **3.4.1 AG 1051**

É um híbrido diferenciado, visto que apresenta grande quantidade de massa verde e alta digestibilidade, sendo indicado como alimento para ruminantes, para produção de grãos, como também é líder na produção de milho verde e pamonha. Possui um excelente sistema radicular, permitindo grande amplitude de época de plantio. Seu ciclo é semiprecoce, com florescimento de 60-80 dias, atingindo a maturação fisiológica entre 133 a 139 dias, obtendo o ponto de colheita, quando a umidade de grãos estiver em torno de 25%.

As plantas possuem porte alto, qualidade do colmo boa, empalhamento excelente, Stay Green bom, tempo de pós-colheita de 3 dias e, sob refrigeração, pode ficar de 3 a 4 dias. O ponto de período de corte para ensilagem é 110 – 120 dias, a faixa de padrão desejável de matéria seca (Ton/ha) é de 16-18 >15, nutrientes digestíveis totais N.D.T de 70,3>65 da proteína bruta P.B, com 7,6 >7 digestibilidade excelente de análise em método NIRS. Recomendações de plantio são de 45 – 50 mil/ha de plantas em função da época e altitude; em seu alto desempenho, pode produzir de 335 a 550 sacos de 25 kg de milho (AGROCERES).

#### **3.4.2 AG 4051**

É indicado para produtores que buscam silagem de qualidade, quando se almejam a alta produção de leite e de carne, para produção de grãos de milho verde profissional. Seu ciclo é semiprecoce, possuem porte alto, qualidade do colmo boa, inserção de espiga alta, empalhamento excelente, sistema radicular bom e Stay Green bom. Apresenta padrão de espiga excelente visualmente, sendo grande, uniforme e sadio e, ainda, suporta um maior tempo de banca. Sua recomendação para plantio é de 45 – 50 mil/ha de plantas em função da época e altitude (AGROCERES).

#### **3.4.3 AL *Bandeirante***

É uma variedade resultante do cruzamento ao acaso de cultivares de ciclo normal; é obtida após várias gerações de recombinação, seleção massal e seleção entre famílias de meio irmãos. Foi lançada em 2001, sua procedência é do Departamento de sementes, mudas e matrizes /CATI. Seu ciclo é semiprecoce, de 130 a 140 dias, o florescimento ocorre de 62 a 63 dias após a semeadura, possui Altura média de plantas em torno de 2,30 m e da inserção de

espiga de 1,25 m. Recomendado para solos de baixa a alta fertilidade, sendo superrústico, com adaptabilidade e estabilidade produtiva semelhantes ao AL 25; possuindo uma excelente resistência ao acamamento. Os estandes de plantas recomendado é de 60 mil plantas/ha, sendo que a variedade tem o potencial de produção de 10.000kg/ha<sup>-1</sup> (CATI).

### **3.5 Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o programa ASSISTAT VERSÃO 7.7 BETA (SILVA, 2002) para normalidade e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett. Os dados que não apresentaram normalidade e homogeneidade sofreram transformação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Skott–Knot a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003) para todos os experimentos.

### **3.6 Experimento I: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio.**

#### ***3.6.1 Delineamento experimental***

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições, totalizando 126 vasos com capacidade para 12 Kg. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 7 X 3, sendo seis bactérias e um controle sem inoculação e 2 doses de nitrogênio (60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>) de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> e um controle.

### ***3.6.2 Semeadura e adubação***

Em março de 2013, foi realizada a semeadura do híbrido de milho AG 1051, sendo 4 sementes por vaso. Todos os vasos receberam os tratamentos citados anteriormente, sendo que as sementes foram inoculadas duas horas antes do plantio. Para a adubação nitrogenada, foram aplicados  $50 \text{ mL dm}^{-3}$  da solução em cada vaso, na forma de sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ; a aplicação de fósforo e potássio foi feita antes do solo ser colocado nos vasos, sendo misturado de forma homogênea.

A adubação de nitrogênio foi realizada de forma parcelada, em três aplicações, uma no plantio, duas em cobertura 15 dias pós-plantio e a outra aos 30 dias. Após 15 dias da emergência das plântulas, foi feito o desbaste, mantendo duas plantas por vaso.

### ***3.6.3 Variáveis analisadas nos experimentos***

Após 60 dias de semeadura, as plantas foram coletadas e as variáveis analisadas.

#### ***3.6.3.1 Altura de plantas***

As mensurações das plantas foram feitas na retirada do experimento, utilizando réguas de 2 metros da base da planta até a última folha expandida, para obtenção das alturas.

### ***3.6.3.2 Acúmulo de massa fresca e seca de parte aérea***

Após a coleta das plantas, a massa fresca foi avaliada por pesagem e, em seguida, levadas à estufa de circulação, forçada a 65° C, por 48 horas. Sendo pesadas novamente para obtenção de valores de massa seca.

## **3.7 Experimento II: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio.**

### ***3.7.1 Delineamento experimental***

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, totalizando 210 vasos com capacidade para 12 Kg. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial triplo 7x3x2, sendo seis bactérias e um tratamento controle e 2 doses de nitrogênio (60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>), utilizando sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> e um tratamento controle, e 2 genótipos de milho, o AL bandeirantes e AG 4051. Utilizando-se as mesmas bactérias do primeiro experimento.

### ***3.7.2 Semeadura e adubação***

A semeadura do híbrido de milho AG 4051 e da variedade AL Bandeirantes, em casa de vegetação, foi realizada em maio de 2013, sendo colocadas 4 sementes em cada vaso. Todos os vasos receberam os tratamentos citados anteriormente, sendo que as sementes já estavam inoculadas e, para adubação, foram aplicados 50 mL dm<sup>-3</sup> da solução em cada vaso de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>); a aplicação de fósforo e potássio foram feitas antes do solo ser colocado nos vasos, sendo misturado no solo de forma homogênea.

A adubação de nitrogênio foi de forma parcelada, em três aplicações, uma de plantio, duas de cobertura, respectivamente, 15 dias pós-plantio e a outra

aos 30 dias. Após 15 dias da emergência das plântulas, foi feito o desbaste deixando duas plantas por vaso.

### **3.8 Experimento III: Avaliar respostas dos genótipos de milho a fontes e proporções diferentes de nitrogênio associada à inoculação com bactérias diazotróficas.**

#### ***3.8.1 Delineamento experimental***

Os tratamentos foram distribuídos inteiramente ao acaso, utilizando 160 vasos com capacidade de 12 kg, arranjos em esquema fatorial triplo 4x5x2, com 4 repetições, sendo utilizadas as bactérias ZAE 94, J10 E, o inoculante líquido Masterfix Gramíneas® e um controle não inoculado; foi selecionada a dose de 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, que foi a mais responsiva nas variáveis testadas nos experimentos anteriores. Dois adubos nitrogenados, o Nitrato de Cálcio e Sulfato de amônio, foram selecionados para serem feitas as seguintes combinação 0NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : 100 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 25NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 75NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 50NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 50 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 75NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 25NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. E dois genótipos de milho, o AL bandeirante e o AG 1051.

#### ***3.8.2 Semeadura e adubação***

A semeadura foi realizada em novembro de 2013, utilizando o Híbrido AG 1051 e a variedade AL bandeirante. Cada vaso contendo 4 sementes foi submetido aos tratamentos citados anteriormente. Na adubação, foram aplicados 50 mL da solução em cada vaso, nas proporções citadas de nitrato de cálcio (Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) e sulfato de amônio ( (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>). A adição de fósforo e potássio foi feita antes do solo ser colocado nos vasos, sendo misturado homogeneamente.

A adubação de nitrogênio foi de forma parcelada, em três aplicações, uma de plantio e duas de cobertura, sendo a primeira com 15 dias pós-plantio e a

outra aos 30 dias. Após 15 dias da emergência das plântulas, foi feito o desbaste, deixando duas plantas por vaso e realizando o transplântio para alguns vasos.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio.

Neste experimento, não houve diferença significativa com o uso de inoculantes ou do tratamento controle referentes às características de altura e massa fresca de parte aérea. De modo similar, não houve diferença significativa das doses no uso das demais bactérias e também no tratamento controle (TABELA 1).

**Tabela 1.** Altura (ALT) e massa fresca de parte aérea (MFPA) do milho híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.

Tratamentos	ALT(cm)			MFPA(g)		
	Mg/ha					
Bactéria <sup>a</sup> /Dose N	0	30	90	0	30	90
Masterfix	55,73aA	57,35aA	57,91aA	74,66aA	88,38aA	98,66aA
ZAE94	46,95aA	53,22aA	56,71aA	60,25aA	61,33aA	76,08aA
Isolado SP245	47,68aA	53,02aA	60,22aA	63,00aA	83,25aA	85,00aA
Isolado J9	49,47aB	51,53aB	64,92aA	73,66aB	61,75aB	110,16aA
Isolado J10	46,55aB	49,16aB	67,85aA	78,00aB	75,41aB	113,58aA
Isolado N13	52,92aA	58,00aA	64,69aA	54,75aB	82,91aB	100,83aA
Controle	49,95aA	54,20aA	62,21aA	61,75aB	87,41aB	109,25aA
Média geral	48,89	53,78	62,07	66,58	77,27	99,08
CV (%)		16,58%			35,73%	

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Embora não exista diferença significativa das doses no uso das demais bactérias e também no tratamento controle, pode ser observado que o isolado N13 também apresentou superioridade na dose de 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, e o isolado SP245 apresentou menores valores em relação aos demais (TABELA 1).

Porém, ao avaliar as repostas da inoculação e adubação nitrogenada, quando comparadas ao controle para variável altura, no tratamento sem acréscimo de adubação nitrogenada, o uso do isolado nativo N13 e o inoculante comercial Masterfix (a base de *Azospirillum* spp.) promoveram incrementos de 5,94% e 11,57%, na altura das plantas (TABELA 2).

**Tabela 2.** Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de Altura (ALT) relacionados às médias da tabela 1.

Tratamentos Bactéria/ <sup>Dose N</sup>	ALT(cm)		
	0	(%)	
		30	90
Masterfix	11,57	2,82	-6,91
ZAE94	-6,00	-7,84	-8,84
Isolado SP245	-4,54	-8,72	-3,19
Isolado J9	-0,96	-14,11	4,53
Isolado J10	-6,80	-2,36	9,06
Isolado N13	5,95	-12,02	3,98

\*Valores precedidos por sinal (-) indicam déficits em relação controle, os valores sem sinal indicam incremento.

Pazos & Hernandez (2001), avaliando a interação de estirpes nativas do gênero *Azospirillum brasilense* na cultura do arroz, também verificaram que houve diferença significativa em incremento de altura das plântulas, com uso de cinco cepas nativas em relação ao controle.

Estes resultados, com uso desta bactéria na inoculação em milho, podem ser atribuídos por ela promover o aumento da superfície de absorção das raízes, resultantes de uma relação de troca, já que as raízes liberam componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento destas bactérias, permitindo uma maior exploração de minerais e água presente no solo, o que acarreta em maior desenvolvimento e produção das plantas.

Entretanto, o inoculante comercial não foi tão responsivo na dose de 30 Kg ha<sup>1</sup> de N, promovendo uma redução de 2,82% na altura das plantas, quando comparado ao tratamento controle.

Todavia, Ramos e outros (2010) obtiveram resultados de maior altura de planta de milho, quando as sementes foram inoculadas com *Azospirillum* spp., em relação à testemunha e à aplicação de 30 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio em cobertura.

Para a dose de 90 Kg ha<sup>-1</sup> de N, houve um incremento de 4,35%, 9,06% e 3,98%, respectivamente, em relação ao controle, quando associados aos isolados J9, J10 e N13 (TABELA 2).

Resultados similares foram observados por Mehnaz e outros (2010), para cultura do milho, quando a inoculação foi associada à alta dose de N via fertilizante.

Estes resultados corroboraram uma das características dessas bactéria,s que é o fato de aproveitarem ao máximo a disponibilidade do nitrogênio no meio em que estão, devido a sua alta afinidade pelo nutriente em questã;, dessa forma, quanto maior for o suprimento de nitrogênio disponível, maior será a sua absorção e, por consequência, maior será o desenvolvimento da planta, devido à alta conversão deste nitrogênio em diversas proteínas.

No entanto, mesmo que os isolados nativos obtivessem respostas na maior dose de nitrogênio, vale ressaltar que as porcentagens de incremento na altura foram menores, quando comparadas ao inoculante comercial no

tratamento sem adição de nitrogênio e, ainda, o isolado nativo N13, manifestou um menor incremento na dose 90 Kg ha<sup>-1</sup>.

Analisando as doses, observa-se que houve diferença significativa entre elas, para variável altura de plantas, associadas às bactérias J9 e J 10. Em ambos os isolados, a dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N promoveu o maior incremento na altura das plantas, sendo os valores de 64,92 cm e 67,85 cm de cada isolado, respectivamente. Estes valores representam um incremento 31,23% do isolado J9 e de 37,15% do isolado J10 em relação ao tratamento sem adição de N e inoculado (TABELA 2).

Em relação à massa fresca, no tratamento sem adição de nitrogênio, houve um incremento de 20,90%, 26,31%, 19,28% e 2,02%, em relação ao tratamento controle, associados aos inoculante comercial Masterfix, isolados J10, J9 e SP245, respectivamente (TABELA 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de Massa fresca de parte aérea (MFPA) relacionados às médias da tabela 1.

Tratamentos	MFPA		
		(%)	
Bactéria <sup>a</sup> /Dose N	0	30	90
Masterfix	20,9	1,62	-9,64
ZAE94	-2,42	-29,83	-30,38
Isolado SP245	2,02	-4,76	-22,20
Isolado J9	19,28	-29,35	0,83
Isolado J10	26,31	-13,73	3,96
Isolado N13	11,33	-5,25	-7,7

\*Valores precedidos por sinal (-) indicam déficits em relação controle, os valores sem sinal indicam incremento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Neto e outros (2013) com uso apenas do Masterfix na dose de 3 mL L<sup>-1</sup>, sem adubação nitrogenada, no qual houve um incremento significativo na massa fresca da parte aérea de 18% e radicular de 33%, comparado ao tratamento sem inoculação. Ainda, os autores justificam que a alta produção de massa fresca da parte aérea e raiz são resultantes da indução de reguladores vegetais nas plantas, através da colonização destas no colmo e sistema radicular, resultantes da FBN (NETO e outros, 2013).

O incremento observado na dose 30 Kg ha<sup>-1</sup> de N, com o uso da bactéria Masterfix, foi 1,62% superior ao tratamento controle. Já a dose de 90 Kg ha<sup>-1</sup> de N, os isolados J9 e J10 promoveram um incremento de 0,83% e 4,96% em relação ao controle (TABELA 3).

A variável massa fresca apresentou o mesmo padrão que os dados de altura, no qual houve diferença significativa entre as doses. No entanto, a dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N foi a que promoveu maiores incrementos na presença dos isolados J9, J10, N13 e o controle. Os isolados J9 e J10 também apresentaram as maiores médias, com 110,16g e 113,58 g de massa fresca (TABELA 1).

Quanto à massa seca, houve diferença significativa entre as bactérias no tratamento sem a adição de N. O isolado J10 apresentou o melhor resultado, tendo um incremento de 52,75% em relação ao tratamento controle (TABELA 4).

**Tabela 4.** Massa seca de parte aérea (MSPA) de milho híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.

Tratamentos Bactéria/ Dose N	MSPA(g)		
	Mg/ha		
	0	30	90
Masterfix	25,50Ba	28,16bA	26,58bA
ZAE94	21,91bA	24,83bA	23,21bA
Isolado SP245	21,66Ba	25,08bA	26,50bA
Isolado J9	24,83Ba	22,33bA	31,08bA
Isolado J10	34,50aA	31,00Ba	32,83bA
Isolado N13	21,75Ba	27,83Ba	21,41bA
Controle	22,58Ba	26,33Ba	29,50bA
Média geral	24,67	26,5	24,37
CV (%)		29,10%	

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

No presente trabalho, esta diferença pode ser explicada devido ao isolado J10 ser nativo, sendo mais competitivo e eficiente tanto para se estabelecer no solo e na superfície da raiz.

Sabe-se que a característica de massa seca é uma das mais importantes a serem avaliadas em um experimento, pois significa o quanto de massa a cultura acumulou ao longo de seu ciclo, sendo assim bastante importante para determinar a produtividade da cultura e, tendo em vista que neste tratamento não houve a presença de nitrogênio, então, todo incremento obtido é responsável somente pela ação do isolado J10 como fixador de nitrogênio.

Avaliando-se as doses, não houve diferença significativa entre elas para massa seca, todavia, novamente os isolados J9 e J10 proporcionaram uma tendência a um maior incremento na massa seca do milho, tendo valores de 5,35% e 11,28% superiores ao controle na dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N (TABELA 5).

Tabela 5 - Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de Massa seca de parte aérea (MSPA) relacionados às médias da tabela 4.

Tratamentos Bactéria/ <sup>Dose N</sup>	MSPA (%)		
	0	30	90
Masterfix	12,9	6,95	0,27
ZAE94	-2,96	-5,69	-21,32
Isolado SP245	-4,07	-4,74	-10,16
Isolado J9	9,96	-15,19	5,35
Isolado J10	52,79	17,74	11,28
Isolado N13	-3,68	5,69	-7,08

\*Valores precedidos por sinal (-) indicam déficits em relação controle, os valores sem sinal indicam incremento.

Similarmente, Santos (2013) também encontrou resultados com os isolados nativos, quando associados à dose de 100Kg ha<sup>-1</sup> de N, promovendo acréscimo de 6,3% e 9,1% na produção de grãos, quando comparado ao inoculante comercial e ao tratamento não inoculado.

#### **4.2 Experimento II: Avaliação da interação genótipo de milho, bactéria diazotrófica e fontes de nitrogênio.**

Neste experimento não houve diferença significativa entre as bactérias utilizadas (TABELA 6).

**Tabela 6.** Altura (ALT) do milho cultivar AL Bandeirante e híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.

Bactéria/ <sup>Dose N</sup>	AL Bandeirante			AG1051		
	ALT(cm)					
	Mg/há					
	0	30	90	0	30	90
Isolado						
SP245	61,50aA	61,98aA	57,26aA	53,24aA	59,62aA	65,58aA
Isolado J9	55,72aA	64,56aA	65,14aA	58,34aA	67,52aA	65,50aA
Isolado N13	45,32aA	53,12aA	66,08aA	58,43aA	58,71aA	64,96aA
ZAE94	57,18aA	55,76aA	58,03aA	57,70aB	52,26Ab	75,06aA
Masterfix	51,46aA	62,16aA	67,66aA	59,4aA	57,18aA	67,44aA
Isolado J10	59,80aA	60,52aA	63,66aA	60,10aA	70,66Aa	66,95aA
Controle	50,52aA	60,32aA	58,80aA	60,11aA	62,14Aa	76,90aA
Média geral	54,5	59,77	62,37	58,17	61,15	78,4
CV (%)		24,39%				

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Porém, podemos observar que na característica de altura na variedade Al Bandeirante, no tratamento sem adição de nitrogênio, houve incremento superior ao tratamento controle com todas as bactérias utilizadas, com exceção somente do isolado N13, que apresentou uma redução na altura de 10,29% em relação ao tratamento controle; as demais promoveram um incremento de 21,73%, 10,29%, 13,18%, 1,86% e 18,36% nas bactérias SP245, isolado J9, J10, ZAE94, e no inoculante comercial Masterfix (TABELA 7).

**Tabela 7.** Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de altura (ALT) relacionados às médias da tabela 6.

Bactéria/ <sup>Dose N</sup>	AL Bandeirante			AG4051		
	ALT					
	(% )					
	0	30	90	0	30	90
Isolado SP245	21,73	2,75	-2,62	-11,42	-4,05	5,58
Isolado J9	10,29	7,03	10,78	-2,94	8,65	5,45
Isolado N13	-10,29	-11,94	12,38	-2,94	-5,52	4,58
ZAE94	13,18	-7,56	-1,3	-4,00	-15,32	20,85
Masterfix	1,86	3,05	15,06	-1,78	-7,98	8,58
Isolado J10	18,36	0,33	8,26	-0,01	13,71	7,79

\*Valores precedidos por sinal (-) indicam déficits em relação controle, os valores sem sinal indicam incremento.

Todavia, para dose de 30 kg ha<sup>-1</sup> de N, juntamente com as bactérias SP245, isolado J9, Masterfix, e o isolado J10 apresentaram incrementos de 2,75%, 7,03%, 3,05% e 0,33% em altura de da variedade AL bandeirante. E na dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, os isolados J9, N13, Masterfix e J10 tiveram valores de altura de 10,78%, 12,38%, 15,06% e 8,26% superiores ao controle (TABELA 7).

No híbrido AG4051, foram observados incrementos em altura de plantas nas doses 30 kg ha<sup>-1</sup>, quando associadas aos isolados nativos J9 e J 10 de 8,65% e 13,71%. E na dose de 90 kg ha<sup>-1</sup>, associada a todas bactérias (TABELA 7).

Em síntese, ambos os genótipos demonstram responsivos no desenvolvimento vegetativo das plantas, quando associados aos isolados nativos J10 e J9, na ausência ou menor dose de nitrogênio aplicado.

De modo similar, Guimarães e outros (2010) também relevam que a associação da inoculação com ausência ou baixa dose de N pode proporcionar ao vegetal o mesmo benefício que quando associadas à alta condição de

fertilizantes N. Além disso, algumas bactérias diazotróficas produzem hormônios como auxina, giberelinas e citocininas, que auxiliam na produção vegetal (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008).

Por outro lado, a interação bactéria x dose foi significativa na presença da cultivar AG4051, para a característica de altura com a bactéria ZAE94, na dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, apresentando diferença de 30,08% em relação à dose 0 de N (TABELA7).

Contudo, vale ressaltar que a cultivar AL bandeirantes, associadas a todas as doses, respondeu ao incremento na altura das plantas, junto à adição do inoculante Masterfix e ao isolado SP245. Sendo que o tratamento sem adição de nitrogênio, associado à bactéria SP245, promoveu um maior incremento de altura.

Para a característica de massa fresca, entre as bactérias utilizadas, não apresentaram diferença significativa (TABELA 8 ).

**Tabela 8.** Massa fresca de parte aérea (MFPA) do milho cultivar AL Bandeirante e híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.

Bactéria/Dose N	AL Bandeirante			AG4051		
	MFPA(g)					
	Mg/ha					
	0	30	90	0	30	90
Isolado SP245	118,60aA	110,20Aa	87,40aA	82,60aA	91,60aA	125,20aA
Isolado J9	110,60aA	102,60Ab	108,00aA	102,80aA	125,20aA	140,60aA
Isolado N13	60,80aA	138,40aA	96,40aA	101,00aA	99,40aA	128,40aA
ZAE94	77,40aA	98,80aA	92,60aA	98,80aB	86,20aB	159,80aA
Masterfix	74,40aA	107,70aA	143,60aA	107,00aA	82,20aA	154,00aA
Isolado J10	74,00aA	135,00aA	116,40aA	118,60aA	149,00aA	130,00aA
Controle	79,80aA	105,40aA	127,80aA	128,00aA	106,00aA	172,60aA
Média geral	85,05	114,01	110,31	105,45	93,91	144,37
CV (%)		45,53%				

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Embora não significativo, pode-se observar que a variedade AL Bandeirante, no tratamento sem adição de nitrogênio e associado às bactérias SP245 e J9, proporcionou maior aumento de massa fresca de 48,62% e 38,59% em relação ao controle. Porém, para o Híbrido AG 4051, foi o isolado nativo J10 que proporcionou às plantas maior valor de massa fresca de 40,56%, na ausência de N ou associada a 30 Kg ha<sup>-1</sup>, sendo 7,34% inferior ao controle (TABELA 9).

**Tabela 9.** Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de massa fresca de parte aérea (MFPA) relacionados às médias da tabela 8.

Bactéria/ Dose N	AL Bandeirante			AG4051		
	MFPA					
	(% )					
	0	30	90	0	30	90
Isolado SP245	48,62	4,55	-3,16	-35,46	-13,58	-27,46
Isolado J9	38,59	-2,65	-15,49	-19,68	18,11	-18,50
Isolado N13	-23,80	31,3	-24,56	-21,09	-6,23	-25,60
ZAE94	-3,00	-6,26	-27,54	-22,81	-18,6	-7,41
Masterfix	-6,76	2,18	14,23	-16,40	-22,45	-10,77
Isolado J10	-6,76	28,08	-8,92	-7,34	40,56	-24,68

\*Valores precedidos por sinal (-) indicam déficits em relação controle, os valores sem sinal indicam incremento.

A interação dose X bactéria foi significativa para cultivar AG 4051 com a presença da bactéria ZAE94, na dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, apresentando uma diferença de 61,74% em relação ao tratamento controle (TABELA 8).

Estes resultados mostram a importância da interação dose x bactéria x cultivar, assim como citado por Sala e outros (2007), que relatam que o benefício da inoculação com bactérias diazotróficas no milho depende do genótipo utilizado, estirpe e a interrelação entre ambos e o meio ambiente.

Na característica de massa seca, não houve diferença significativa entre as bactérias utilizadas (TABELA 10).

**Tabela 10.** Massa seca de parte aérea (MSPA) do milho cultivar AL Bandeirante e híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculante, cultivado em Vitória da Conquista- BA.

Bactéria/ <sup>Dose N</sup>	AL Bandeirante			AG4051		
	MSPA(g)					
	Mg/ha					
	0	30	90	0	30	90
Isolado SP245	20,60aA	16,00aA	14,40aA	13,00aA	15,00aA	21,40aA
Isolado J9	20,00aA	14,80aA	18,60aA	20,20aA	20,40aA	24,60aA
Isolado N13	9,20aA	22,60aA	15,80aA	17,20aA	15,00aA	23,80aA
ZAE94	12,00aA	22,20aA	14,80aA	18,80aA	12,80aA	27,00aA
Masterfix	11,80aB	18,30aB	34,80aA	18,40aA	15,00aA	28,80aA
Isolado J10	12,80aA	24,60aA	18,40aA	30,40aA	26,00aA	23,00aA
Controle	14,00aA	20,00aA	23,00aA	22,40aA	18,40aA	32,20aA
Média geral	14,34	19,78	19,85	20,05	17,51	25,82
CV (%)	32,57%					

\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dados foram transformados pela equação de Raiz quadrada.

No entanto, ao analisar os dados, observa-se o incremento das mesmas em relação ao controle, sendo que os tratamentos sem a adição de N e com 30 kg ha<sup>-1</sup> acarretaram em maiores valores de matéria seca para variedade AL Bandeirante, quando associados às bactérias SP245 de 47,14%, J9 de 42,85% sem adição de N, e na dose 30, o isolado nativo J10 propiciou um incremento de 22 % em relação controle (TABELA 11).

E avaliando aumento de massa seca do genótipo AG4051, associado a 0 e 30 de N, os isolados J10 e 19 novamente se mostram eficientes em relação ao controle, com incrementos de 35,71% para J10, na ausência de N, e de 10,86% de J9 e 41,30% de J10, na presença de 30 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Tais resultados indicam, mais uma vez, a importância da seleção de genótipos eficientes na interação com a estirpe utilizada, de forma que propiciem um melhor desenvolvimento e produção das plantas, sem uso de grandes quantidades de adubo nitrogenado.

**Tabela 11.** Porcentagem de incrementos e déficits em relação ao tratamento controle, valores de massa seca de parte aérea (MSPA) relacionados às médias da tabela 10.

Bactéria/Dose N	AL Bandeirante			AG4051		
	MSPA					
	0	30	90	0	30	90
Isolado SP245	47,14	20,00	37,39	-41,96	-18,47	-33,54
Isolado J9	42,85	-26,00	-19,13	-9,82	10,86	-23,60
Isolado N13	-34,28	13,00	-31,3	-22,52	-18,47	-28,57
ZAE94	-14,28	11,00	-35,65	-16,07	-30,43	-16,14
Masterfix	-15,70	-8,50	51,30	-17,85	-18,47	-10,55
Isolado J10	-8,50	22,00	-20,00	35,71	41,30	-28,57

\*Valores precedidos por sinal (-) indicam déficits em relação controle, os valores sem sinal indicam incremento.

Na dose 90 kg ha<sup>-1</sup> de N, na cultivar AL Bandeirantes, a bactéria Masterfix promoveu incremento de 51,30% de massa seca, já para a cultivar AG4051, não houve incremento com o uso de nenhuma das bactérias utilizadas, sendo que a bactéria Masterfix mais se aproximou do controle, apresentando-se 10,55% inferior (TABELA 11).

Todavia, vale ressaltar que a interação dose x bactéria foi significativa, na qual a melhor dose para produção de massa seca é a de 90 kg ha<sup>-1</sup> de N,

associada à inoculação com produto comercial Masterfix, sendo superior a 194,91% em relação ao controle (TABELA11). Mas, vale ressaltar, que a bactéria J10 teve resposta quando aplicados 0 e 30 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Do mesmo modo, Guimarães e outros (2003) também observaram efeitos positivos e negativos no acúmulo de massa seca dos grãos, devido à interação estirpe x cultivar.

Fernandes e outros (2005), trabalhando diferente cultivares, também evidenciaram diferenças significativas na utilização de nitrogênio pelas plantas. Tais resultados demonstram que esta variação na eficiência dos genótipos em utilizar eficientemente o nitrogênio fornecido está ligada às variações genéticas que ocorre entre os genótipos de milho (ALFODI e outros, 1992).

E ainda, sendo confirmado por Reis e outros, (2000), que a falta de sucesso com inoculação em gramíneas estão ligadas ao uso de linhagens inadequadas.

#### **4.3 Experimento III: Avaliar respostas dos genótipos de milho a fontes e proporções diferentes de nitrogênio associada à inoculação com bactérias diazotróficas.**

Neste experimento, todos os dados das variáveis foram transformados e, a partir destes, pode-se observar que houve diferença significativa entre as doses combinadas das fontes utilizadas, sendo que a proporção de 75-25 de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : NH<sub>4</sub><sup>+</sup> promoveu incremento na altura das plantas e as bactérias ZAE94, Masterfix e o tratamento controle obtiveram as maiores médias na variedade AL Bandeirante, apresentando os valores de 140,57 cm; 114,52 cm e 129,77 cm, respectivamente (TABELA 12).

Resultados similares foram encontrados por Sousa e outros (2010), com berinjela, em que a maior altura de plantas foi obtida na proporção de 75-25 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  com variação total de 16,9 %.

Entretanto, Oliveira e outros (2008), trabalhando com milho de pipoca com diferentes proporções de adubo nitrogenado, não obtiveram diferença na altura das plantas.

Analisando a presença das bactérias em cada cultivar, separadamente, mesmo que não significativo, consegue ser observado que houve incremento em altura na variedade AL Bandeirante, quando submetida à combinação 75-25 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  e associada às bactérias ZAE94, atingindo o valor de 140,57 cm. No entanto, o inoculante comercial masterfix e o isolado J10 apresentaram os melhores resultados na combinação 25-75 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , com 140,65cm e 122,55cm de altura (TABELA 12).

Para o Híbrido AG1051, juntamente com a bactéria ZAE94 e com a combinação de 100-0  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , resultou em sua maior média de altura de 137,62 cm, já o inoculante Masterfix foi melhor na combinação de 50-50 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  com altura de 138,52 cm, e o isolado J10 obteve sua maior média na combinação de 75-25 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , atingindo 121,30cm (TABELA12).

**TABELA 12-** Altura (ALT) do milho variedade AL bandeirante e Híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculantes, cultivados em Vitória da Conquista – BA.

Bactéria/ Fonte /Dose	AL Bandeirante	AG 1051								
	ALT(cm)									
	0 - 100 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		25 - 75 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		50 - 50 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		75 - 25 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		100 - 0 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
ZAE94	117,25 <sup>a</sup>	105,2A	88,55 <sup>a</sup>	82,17A	104,92a	95,65A	140,57a	114,05A	121,60A	137,62A
Masterfix	95,55 <sup>a</sup>	120,62A	140,65 <sup>a</sup>	75,77 A	85,85a	138,52A	114,52a	113,2A	85,75A	102,95A
Isolado J10	102,17 <sup>a</sup>	108,02A	122,55 <sup>a</sup>	104,75A	104,42a	110,57A	78,50B	121,30A	108,50A	106,70A
Controle	87,77 <sup>a</sup>	109,17A	121,75 <sup>a</sup>	101,50A	109,40a	127,05A	129,77a	99,52A	121,15A	94,80A
Média geral	100,68	110,75	118,37	91,04	101,14	117,94	115,84	87,01	109,25	110,51
CV(%)	6,48	32,6								

- Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo test de Skott-Knot a 5% de probabilidade.
- Dados da variedade AL bandeirante forma transformados pela equação Log na base d10 de Y.

Como se podem perceber, os resultados em incremento de altura de plantas variaram conforme interação genótipo e estirpe utilizada, sendo que a proporção de 75:25 de  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$  foi a que mais favoreceu na expressão da planta em altura, em função da bactéria utilizada.

Dessa forma, pode-se inferir que este resultado possa estar correlacionado com a maior quantidade de amônio presente, o que acarreta na inibição da nitrogenase, fator este que também foi confirmado por outros autores, pois, segundo Okon e outros (1976), o íon amônio em altas concentrações podem inativar a glutamina sintetase. Além disso, Rudnick e outros (1997) também constataram a inatividade da enzima nitrogenase de forma rápida e reversível, quando submetida a altas concentrações deste íon.

Por outro lado, Cruz (2007), em experimento com mandioca, também estudando os diferentes efeitos das proporções de fonte nitrogenada no crescimento das plantas, quando cultivadas exclusivamente com  $\text{NH}_4^+$ , percebeu um menor crescimento das plantas, em virtude da ação negativa deste íon sobre a atividade fotossintética.

Além disso, quando se diminui a taxa de fotossíntese, as plantas são prejudicadas em crescimento, visto que irá prejudicar sua condutância estomática, acarretando em uma menor abertura e fechamento dos estômatos, e, por conseguinte, a transpiração e fotossíntese (SILVA e outros 2010).

De modo similar, Claussen & Lenz (1999) reafirmam a ideia de que a resposta fotossintética das plantas, quando supridas apenas com  $\text{NH}_4^+$ , é dependente da espécie em que se está sendo utilizada.

Para variável massa fresca da variedade AL Bandeirante, houve diferença significativa na combinação de 25-75 de  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$ , obtendo maiores médias, quando associada às bactérias Masterfix e ao isolado J10, atingindo valores de 168,75 g e 139,00 g (TABELA 13).

**TABELA 13-** Massa fresca parte aérea (MFPA) do milho variedade AL bandeirante e Híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculantes, cultivados em Vitória da Conquista – BA.

Bactéria/Fonte /Dose	AL		AL		AL		AL		AL	
	Bandeirantes	AG 1051	Bandeirantes	AG 1051	Bandeirantes	AG 1051	Bandeirantes	AG 1051	Bandeirantes	AG 1051
	MFPA(g)									
	0-100 NO3- : NH4+		25-75 NO3- : NH4+		50-50 NO3- : NH4+		75-25 NO3- : NH4+		100-0 NO3- : NH4+	
ZAE94	112,50 <sup>a</sup>	110,00A	82,00B	97,00A	164,75a	116,75a	181,00A	168,75A	156,50A	183,00A
Masterfix	117,75 <sup>a</sup>	134,25a	168,75 <sup>a</sup>	72,00A	88,00A	157,25a	199,75a	199,75A	134,25A	111,00A
Isolado J10	117,75 <sup>a</sup>	118,75a	139,00A	149,50A	11,50a	152,00A	154,25A	154,25A	141,00A	136,25A
Controle	118,50 <sup>a</sup>	124,25a	149,50 <sup>a</sup>	153,00A	141,75a	142,75a	123,50A	123,50A	132,00A	104,00A
Média geral	116,62	121,81	134,86	117,87	126,31	142,18	148,12	161,56	140,93	133,56
CV(%)	19,84	42,26								

- Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo test de Skott-Knot a 5% de probabilidade.
- Dados do Híbrido AG 1051 forma transformados pela equação raiz quadrada..

Avaliando separadamente cada genótipo e as bactérias, mesmo que não sendo significativo, observamos que a variedade AL bandeirante, em associação com a bactéria ZAE 94 na combinação de 75-25 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , resultou em maiores médias de massa fresca, atingindo 181,00 g de massa fresca. Porém, o inoculante Masterfix e o isolado J10 tiveram maiores médias, quando combinados com 25-75 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , com massa fresca de 168,75 g e 139,00 g (TABELA 13).

O uso da variedade AL Bandeirante, associada ao inoculante comercial Masterfix e à combinação de 25:75  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , expressou melhor acúmulo de biomassa fresca. Fator este que está ligado à rusticidade da variedade utilizada, quando comparada ao Híbrido AG 1051, uma vez que o experimento em vaso ao ar livre expõe os genótipos às condições adversas de clima.

Samborski, Kozak e Azevedo (2008) especificam que a eficiência no uso de N está correlacionada com os fatores externos, como clima, solo, fertilizantes e práticas de manejo associadas a características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas do genótipo utilizado.

Este resultado pode ser justificado pelo fato da presença de menor quantidade de nitrato ser favorável ao acúmulo de massa fresca, podendo-se inferir ao fato de que, para sua absorção pela planta, tenha mais custo energético que o íon amônio, já que para a absorção deste íon é necessária ação de substâncias redutoras e de energia ATP, sendo um processo ativo, dependente de energia metabólica para o transporte contra um gradiente de potencial eletroquímico (MACHADO e outros, 2013).

Contudo, avaliando o incremento de matéria fresca do Híbrido AG1051, associado às bactérias e às combinações de fontes de nitrogênio, revela-se que a associação com a bactéria ZAE94, na combinação 100-0 de  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ , proporcionou uma média superior de massa fresca de 183g. E, para o inoculante

masterfix e isolado J10, reponderam em maiores incrementos, quando combinados na proporção de 75-25 de  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$ , atingindo 199,75 e 154,25g de massa fresca do Híbrido (TABELA 13).

Resultados encontrados por García de Salomone e outros (1996) também se assimilam com os encontrados com uso do inoculante comercial, no qual eles avaliaram que o uso de *Azospirillum*, associados às variedades de milho cultivadas em vaso a céu aberto, conseguiu fixar em torno de 58% do suprimento de N requerido pela cultura.

Os valores de massa seca, que apresentaram diferença significativa, foram para a variedade AL Bandeirante com a combinação de 25-75 de  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$  e associada às bactérias Masterfix; e ao isolado J10, que obtiveram os maiores resultados, com 56,25 g ; 41,50 g de massa seca (TABELA 14).

**TABELA 14-** Massa seca da parte aérea (MSPA) do milho variedade AL bandeirante e Híbrido AG1051, inoculado com bactérias diazotróficas e ausência de inoculantes, cultivados em Vitória da Conquista – BA.

Bactéria/Fonte /Dose	AL									
	Bandeirantes	AG 1051								
	MSPA (g)									
	0-100 NO3- : NH4+		25-75 NO3- : NH4+		50-50 NO3- : NH4+		75-25 NO3- : NH4+		100-0 NO3- : NH4+	
ZAE94	34,47 <sup>a</sup>	33,75 <sup>a</sup>	23,75 <sup>B</sup>	35,52 <sup>A</sup>	38,72 <sup>a</sup>	31,50 <sup>a</sup>	57,50 <sup>A</sup>	60,50 <sup>A</sup>	55,00 <sup>A</sup>	47,00 <sup>A</sup>
Masterfix	30,30 <sup>a</sup>	50,58 <sup>a</sup>	56,25 <sup>a</sup>	22,18 <sup>A</sup>	31,25 <sup>a</sup>	36,00 <sup>A</sup>	43,67 <sup>A</sup>	57,82 <sup>A</sup>	41,50 <sup>A</sup>	39,67 <sup>A</sup>
Isolado J10	33,66 <sup>a</sup>	35,66 <sup>a</sup>	41,50 <sup>a</sup>	44,75 <sup>A</sup>	33,46 <sup>a</sup>	43,00 <sup>A</sup>	26,72 <sup>A</sup>	50,75 <sup>A</sup>	27,76 <sup>A</sup>	36,90 <sup>A</sup>
Controle	33,02 <sup>a</sup>	40,50 <sup>a</sup>	49,47 <sup>a</sup>	38,33 <sup>A</sup>	43,75 <sup>a</sup>	35,99 <sup>a</sup>	46,75 <sup>A</sup>	39,66 <sup>A</sup>	39,65 <sup>A</sup>	38,83 <sup>A</sup>
Média geral	32,36	40,12	37,49	35,19	36,79	36,62	43,66	52,18	40,97	40,6
CV(%)	11,58	20,95								

- Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo test de Skott-Knot a 5% de probabilidade.
- Dados da variedade AL bandeirante forma transformados pela equação raiz quadrada..

Ainda que não seja significativa, a avaliação dos genótipos e as bactérias, de forma separada, demonstram que, para variedade AL bandeirante, expressou em maior volume de massa seca, quando combinada com 75-25  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$ , obtendo resultado de 57,50 g de massa seca, quando inoculada com a bactéria ZAE 94. Já a Masterfix e o isolado J10 tiveram maiores incrementos de massa seca na combinação de 25-75 de  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$  com valores de 56,25 g e 41,50 g (TABELA 14).

Para combinações de proporções fonte de nitrogênio em rendimento de matéria seca, a adição de 25:75  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  na variedade AL Bandeirantes apresentou melhor resposta nesta variável. A possível explicação pra tal resposta é que a exigência energética para assimilação do amônio é menor que a necessária para o nitrato, pois a amônia não precisa ser reduzida para que seja incorporada em aminoácidos.

Como sugerido por Alcantara e outros (2009), para metabolizar o nitrato, houve um gasto de 23% de toda energia produzida na raiz da cevada em relação aos 14% exigidos no metabolismo de  $\text{NH}_4^+$ .

No entanto, o Híbrido AG1051 obteve maiores incrementos em massa seca, quando associado a uma maior dose de nitrato do que de amônio. As bactérias ZAE94 , Masterfix e o isolado J10, na combinação 75-25 de  $\text{NO}_3^-$  :  $\text{NH}_4^+$ , obtiveram os maiores valores, com média de 60,50g; 57,82g e 50,75 g ( TABELA 14).

De modo similar, em trabalho com a cultura do girassol, o uso de maior quantidade de nitrato resultou em maior massa seca da haste, nas relações 0:100 e 25:75 ( $\text{NH}_4^+$  :  $\text{NO}_3^-$ ), resultando nas maiores médias desta variável (0,81 e 0,72 g), sendo verificado uma redução 66, 7% de massa seca, quando submetidas apenas a amônio. E a relação 0:100 ( $\text{NH}_4^+$  :  $\text{NO}_3^-$ ) promoveu aumento no teor de massa seca de folha e parte aérea, comparadas a 100:0 ( $\text{NH}_4^+$  :  $\text{NO}_3^-$ ), relatando este incremento pela ausência do amônio (ALVES e outros, 2013).

A diferença da expressão dos genótipos, sob as proporções de adubos fertilizados, está ligada na eficiência que cada um possui em utilizar os nutrientes.

Assim, a adaptação de genótipo de milho a ambientes em que os nutrientes não estejam prontos ao uso está relacionada com a predominância do tipo de íon no solo e à associação com microrganismos benéficos, como as bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas (JUNIOR e outros, 2008).

Diante dos resultados, observa-se que os parâmetros avaliados dos genótipos de milho utilizados variaram em incrementos, diante da proporção do adubo e associação com as bactérias utilizadas. Sendo assim, pode-se inferir que a presença do íon amônio e nitrato podem promover benefícios, desde que sejam usados de forma balanceada, pois o excesso de amônio, por exemplo, prejudica a atividade da enzima nitrogenase das bactérias fixadoras em disponibilizar nitrogênio à planta, como também, o excesso de nitrato requer alto gasto energético para ser assimilado.

Além disso, as fontes de nitrogênio que foram aplicadas no solo, contendo nitrato ou amônio, promoveram alteração do pH da rizosfera, logo, é sabido que, quando se aplica fonte amoniacal, o pH diminui e, se for nítrica, o pH se eleva. Portanto, a alteração do pH no solo pode ter influenciado na melhor eficiência das bactérias utilizadas, visto que estas necessitam de pH apropriado para sua sobrevivência.

Em síntese, o trabalho mostrou-se eficiente em demonstrar a importância de se balancear as fontes de nitrogênio utilizadas e se usar genótipos aptos às condições de clima e solo da região, pois, dessa forma, consegue-se uma melhor eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio, resultando em bom desenvolvimento da planta de milho.

## 5 - CONCLUSÕES

- ✓ O isolado J 10 demonstrou resultados promissores para uso como insumo biológico;
- ✓ A variedade AL Bandeirante, quando inoculada, foi mais eficiente nos parâmetros avaliados quando comparada aos híbridos utilizados, por ser mais rústico e mais apto a se desenvolver bem sob as condições edafoclimáticas da região;
- ✓ O balanceamento de íons de nitrato e amônio, submetidos às plantas, favorecem a assimilação e desenvolvimento das mesmas.

## REFERÊNCIAS

AGROCERES. Sementes Agrocere. Milho híbrido AG1051. Disponível em: [http://www.sementesagrocere.com.br/?page\\_id=426](http://www.sementesagrocere.com.br/?page_id=426). Acessado em: 10 Jan,2014.

ALCANTARA, R.M.C.M., DE SOUSA.S.R, XAVIER, G.R., ROCHA,G.R., RUMJANEK, N.G.**Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas.** Embrapa Meio Norte, pg.39, 2009.

ALFOLDI, Z.; PINTER, L. & FEIL, B. Accumulation and partitioning of biomass and soluble carbohydrates in maize seedlings as affected by source of nitrogen, nitrogen concentration and cultivar. **J. Plant Nutr.**, 15:2567-2583, 1992.

ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em Genótipos de Milho.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2007.

ALVES, A.C., DE JESUS, F.N, SILVA, P.C.C., DOS SANTOS, A.R., DE SOUSA, G. S. Diagnose nutricional de mudas de girassol submetidas a proporções de amônio e nitrato. **Rev. Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, pg,72, 2013.

ALVAREZ V, V. H; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de minas gerais (CFSMG). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª aproximação, Viçosa, p.41-60, 1999.

AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.26, p.241-248, 2002.

ASLAM, M., TRAVIS, R.L., HUFFAKER, R.C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare L.*) seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v.99, p.1124-1133, 1992.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 433p.; 2002.

BARBER, K. L.; PIERZYNSKY, G. M. Ammonium and nitrate source. Effects on field crops. J. Fert. Issues., **Manchester**, v. 8, p. 57-62, 1993.

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E. Plant Growth-Promoting In: HILLEL, D., In

**Encyclopedia of soils in the environment.** 1.ed, Oxford.v. 1, pp. 103-115; 2005.

BÁRBARO, I.M; BRANCALIÃO, S.R.; TICELLI, M. **É possível a fixação biológica de nitrogênio no milho?**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_2/fixacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/fixacao/index.htm)>. Acesso em: 03 de Janeiro de 2014.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry.** Oxford, v. 29, n.5-6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen- fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; OLIVEIRA, L.M.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS Jr, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. **Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs.** Embrapa Agrobiologia, Seropédica, p.397-4000, 2000

BRITO, D.T; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M . ET al. Futile transmembrana  $\text{NH}_4^+$  cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** Washington, v.98, p. 4255-4258, 2001.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V (Eds.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa, MG: UFV, p.139-182; 2004.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, I. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: SBCS, p.375-470; 2007..

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A.; FALKOWSKI, P.. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

CATI Disponível em :

[http://www.cati.sp.gov.br/Cati/\\_produtos/SementesMudas/cultivares/MILHO-AL-BANDEIRANTE.pdf](http://www.cati.sp.gov.br/Cati/_produtos/SementesMudas/cultivares/MILHO-AL-BANDEIRANTE.pdf). Acesso em Dezembro de 2013.

CERIGIOLI, M.M; Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – São Carlos-SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 149p. ,2005.

CLAUSSEN, W.; LENZ, F. Effect of ammonium o nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, na activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. **Plant Soil**, Hague, v.208, p.95-102, 1999.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, n.6, p. 1880-1883, set, 2009.

CHEN, W.; LUO, J-K; SHEN, Q.R.; Effect of  $\text{NH}_4^+$  -  $\text{N}/\text{NO}_3^-$  - N ratios on growth and some physiological parameters of chinese cabbage cultivars. ***Pedosphere***, China, vol. 15. P. 310-318, 2005.

Chelius, M.K. & Triplett, E.W. (2001) The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. ***Microbiology Ecology***, v.41, p.252-263.

CRUZ, J.L.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W. L. **Influência do íon amônio e nitrato sobre a atividade fotossintética da mandioca**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2007.

CRAMER, M.D.; LEWIS, O.A.M. The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. ***Annals***: of Botany, London, v.72, n.4, p 359-365, 1993.

CHAVARRIA, G.; MELLO, N. Bactérias do gênero *Azospirillum* e sua relação com gramíneas. *Revista Plantio Direto*, v.125, 2011. Disponível em:< [http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont\\_int&id=1075](http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=1075)>. Acesso em: 20 abr. 2013.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira:** grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2012.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento da safra brasileira de grãos 2012/13 - Oitavo levantamento, maio 2013.** Brasília: Conab, 2013.

CRAWFORD, N. M.; FORDE, B.G. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: THE ARABIOPOSIS Book. American Society of Plant Biologists. Disponível em : [WWW.aspb.org/publications/arabidopsis/toc.cfm](http://WWW.aspb.org/publications/arabidopsis/toc.cfm). Acesso em: Dezembro 2013.

DA ROS, C. O.; AITA, C.; GIACOMINI S. J. Volatilização de amônia com aplicação de uréia na superfície do solo, no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 799-805. 2005

DI CELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4485-4493, 1997.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA, GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S. & OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Aust. J. Plant Physiol.**, 28:871-879, 2001.

DOBEREINER, J., BALDANI, V.L.D, BALDANI, J.L. **Como isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA - RJ, 60p. 1995.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C. e outros. **Economia da produção e utilização do milho. In: Cultivo do milho**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sistema de produção. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/economiadaprodu.htm>>. Acesso em: 13 jan 2014.

DUARTE, D.S.A. Perda de amônia por volatilização em solo tratado com ureia, na presença de resíduos culturais. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz; Piracicaba; 64p.; 2007.

DUARTE, J. O. ; J. C; GARCIA, J. C; MATTOSO, M. J. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, **ISSN 1679-012X** Versão Eletrônica - 6ª edição Set./2010. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/economia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/economia.htm)> acesso em 26/11/2013.

DUAN, Y.H.; ZHANG, Y.L.; SHEN, Q.R.; WANG, S.W. Nitrate effect on Rice growth and nitrogen absorption and assimilation at different growth stages. **Pedosphere**, China, Vol. 16, p.707 – 717, 2006

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2223-2230, 2004.

DOBRITSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M.; Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *Putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 60: 1418-1426; 2010.

EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G. de; AMARAL, P. N. C. do; PEREIRA, R. C.; SALVADOR, F. M.; LOPES, J.; SOARES, L. Q. Composição bromatológica de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) MOENCH) aditivadas com forragem de leucena (*Leucaena leucocephala* (LAM.) DEWIT). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 429-435, 2005.

FREITAS, F.O. **Estudo Genético-Evolutivo de Amostras Modernas e Arqueológicas de Milho ( *Zea mays mays*, L.) e Feijão (*Phaseolus vulgaris*,**

L.). Piracicaba: ESALQ/USP. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 125p, 2001

FERNANDES, F.C.S. **Dinâmica do nitrogênio na cultura do milho (*Zea Mays L.*), em cultivo sucessivo com aveia preta (*Avena strigosa*), sob implantação do sistema plantio direto.** Piracicaba: ESALQ/USP, 197p, 2006. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria.** UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258; 2003.

FERNANDES, F.C.S.; BUZETTI, S.; ARF, O. & ANDRADE, J.A.C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **R. Bras. Milho Sorgo**, 4:195-204, 2005.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

FRYZUK, M. D.; J.S. A.; *Coord. Chem. Rev.* , pg. 200-202, 379, 2000.

FIGUEIREDO, C. C.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C.; URQUIAGA, S.  
Sistemas de manejo na absorção de nitrogênio pelo milho em um Latossolo  
Vermelho no Cerrado. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.279-  
287, 2005.

GARCIA DE SALOMONE, I.E. & DÖBEREINER, J. Maize genotype effects  
on the response to Azospirillum inoculation. **Biol. Fert. Soils**, 21:193-196, 1996

GIVAN, C.V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher  
plants. **Phytochemistry**, Elmsford, v.18, p.375-382, 1979.

GILLIS, M., TRAN VAN, V., BARDIN, R., GOOR, M., HEBBAR, P.,  
WILLEMS, A., SEGERS, P., KERSTERS, K., HEULIN, T., AND  
FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to  
an emended description of the genus and proposition of Burkholderia  
vietnamiensis sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst.*  
*Bacteriol.*, 45, 274–289; 1995.

GOMES, DE L. M. **Bactérias Diazotróficas Endofíticas em cultivares de  
milho em áreas de cerrado e mata no estados de Roraima**. Dissertação  
(Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Roraima. Boa Vista; 79 p.;  
2009.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities  
and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and  
Biochemistry**, v.37;395 – 412 p.; 2005.

GROSS, M. R.; VON PINHO, R. G.; BRITO, A. H. Adubação nitrogenada, densidade de semeadura e espaçamento entre fileiras na cultura do milho em sistema plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 387-393, 2006.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; NETO, J. J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-29, 2010.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.sht>. Acesso em 20 de maio de 2013.

JUNG, S. Y.; LEE, M. H.; OH, T. K.; YONN, J. H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 2284-2288; 2007..

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. Van; ELSAS, J. D. Van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 463-471, 2008.

HURTADO, S.M.C.; RESENDE, A.V.DE; SILVA, C.A.DA; CORAZZA, E.J.SHIRATSUCHI, L. S. Clorofilômetro no ajuste da adubação nitrogenada em cobertura para o milho de alta produtividade. **Rev. Ciência Rural**, Santa Maria, V.41, n.6, p. 1011-1017, jun 2011.

HUERGO, L.F. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 2006. Tese (Doutorado Pós-Graduação em Ciências Bioquímica) - Ciências Bioquímica, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 170 p.; 2006.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JUNIOR, DOS REIS,F.B., MACHADO, DE T.C.T; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipo de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Rev.Brasileira de ciência do solo**, pg.32. 1139-1146, 2008.

KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R. GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p. 65-79, 1997.

KIM, C., M.L. KECSKÉS, R. J. DEAKER, K. GILCHRIST, P.B. NEW, I.R. KENNEDY, S. KIM, T. SA.,. Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolates from crop plants in Korea, Can. **J. Microbiol.**, 51, 948-956.; 2005

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing a bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.363-376, 2000.

LEWIS, O.A.M.; LEIDE, E.O.; LIPS, S.H. Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. **New Phytologist**, New YORK, V. 111,n. 2, p. 155-160, 1989.

LIMA, T. G. **Conseqüências da Remoção do limbo Foliar em diferentes Estádios Reprodutivos da Cultura do Milho**. Minas Gerais: UFLA, 2007, 51p. Tese (Mestre em Fitotecnia em Agronomia) Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2007.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J., LEEGOOD, R.C. **Plant biochemistry and molecular biology**. Chichester: John Wiley and Sons, 1993. Chapt.7. p.155-180.

LOURENE, E.R.P.; ONTOCELLI, R.; SOUZA, L.C.F.; GONÇALVES, M.C.; MARCHETTI, M.E.; RODRIGUES, E.T. Culturas antecessoras, doses e fontes de nitrogênio nos componentes de produção do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.29, p.55-61, 2007.

OKON, Y; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R. H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum Lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.128, p. 592-597, 1976.

OLIVEIRA , F.A.DE; FRANCISMAR, B.P.M.DE; OLIVEIRA.,K.T.DE; GUIMARÃES, I.P.; Desenvolvimento inicial do milho pipoca cultivado sob Diferentes relações  $\text{nh}_4^+:\text{no}_3^-$  ; (Mossoró,Brasil), v.21 n.5 p.197-201, dezembro de 2008.

OLIVEIRA, A.L.M; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic  $\text{N}_2$ -fixing bacteria on micropropagatede sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.241, p. 205-215, 2002.

MAÇAS, J.E.S.**Nitrogênio Nítrico e amoniacal no desenvolvimento da parte aérea de milho cultivado em argissolo**. Porto Alegre – RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo,

Programa de Pós Graduação em Ciência do solo, Faculdade Agronomia) p.58; setembro de 2008.

MACHADO, V.J; DE SOUZA, C.H.E,RIBEIRO,V.J,CAIXETA.C.G; Atividade da redutase do nitrato e desenvolvimento de milho irrigado adubado como fosfato monoamônio polimerizado. **Rev. Brasileira de milho e sorgo**, v. 12, n.3,pg. 203-213, 2013.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 3. ed. Viçosa: UFV, 486p.; 2009.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum species*. **ANAIS**: da Academia Brasileira de Ciências, n. 55, p. 417-430, 1983.

MAGALHÃES, J.R., MACHADO, A.T, FERNANDES, M.S., et al. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.5, n.2, p.163-166, 1993.

MACHADO, A.T., MAGALHÃES, J.R. Melhoria de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1995, Belo Horizonte, MG. **ANAIS...** Belo Horizonte : EMBRAPA/ CNPMS, 449p. p.321-343; 1995.

MEHNAZ, Samina et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, 2010.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Densidade e Diversidade Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Solos de Mineração de Bauxita , em Reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 85-93, 2004.

MISRA N, DWIVEDI, U.N. Nitrogen assimilation in germinating Phaseolus aureus seeds under saline stress. **J Plant Physiol**, Stuttgart, v.135, p.:719–24, 1990.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, p.449-542, 2006.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS; L. C. C.; SCHIMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. **Herbaspirillum- plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects**. DOI 10.1007/s11104-012-1125-7, 2012

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** V. 1; P.74-99; 2010.

MORAIS, Rafael F de et al. Contribution of biological nitrogen to Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 23-34, 2012.

NAMBIAR, P.T.C.; REGO, T.J. & SRINIVASA RAO, B. Nitrate concentration and nitrate reductase activity in the leaves of three legumes and three cereals. **Ann. Appl. Biol.**, 112:547- 553, 1988.

NETO, F.J.D; YOSHIMI, F.K.;GARCIA, R.D.; MIIYAMOTO, Y.R.; DOMINGUES, M.C.S. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, V. 34, n.17; p. 1030, 2013.

OKON, Y; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R. H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum Lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.128, p. 592-597, 1976.

OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; MARACAJÁ, P. B.; OLIVEIRA, M. K. T.; GUIMARÃES, I. P. Desenvolvimento inicial do milho pipoca cultivado sob diferentes relações  $NH_4^+ : NO_3^-$ . **Caatinga**, Mossoró, v.2, n.3, p.163-167, 2008.

OLIVEIRA, F.A. de; CAVALCANTE, L.F.; SILVA, I. DE F. DA; PEREIRA, W. .; OLIVEIRA, J.C. DE; FILHO, J.F. DA C. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um Latossolo Amarelo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.3, p.238-244, 2009.

PAZOS, M.; HERNÁNDEZ, A. Evaluación de cepas nativas del género *Azospirillum* y su interacción con el cultivo del arroz. **Cultivos Tropicales**, v. 22, n. 4, p. 25-28, 2001.

PERIN, A; SANTOS, R. H. S; URQUIAGA, S; GUERRA, J. G. M; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de

nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.1, p.35-40, jan. 2004.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; SANTOS, P.E.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.3103-3110, 2006.

RAMOS, A.S.; SANTOS, T.M.C.; SANTANA, T.M.; GUEDES, E.L.F.; MONTALDO, Y.C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, v.5, n.4, p.113-117, 2010.

RAAB, T.K.; TERRY, N. Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source,  $\text{NO}_3^-$  versus  $\text{NH}_4^+$ . **Plant Physiology**, Bethesda, v.107, p.575–584, 1995.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **CRC Critical Review in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2000.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação Biológica de Nitrogênio – estado da arte. In: **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF.; p. 368; 2005.

REIS, Veronica Massena et al. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, Manlio Silvestre. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Marburg, v.6, n.4, p.139-144, 1998.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. Como a planta de milho se desenvolve. POTAFOS. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.103, p.1-11, 2003.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1341-1348, 2006.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 831 -841, 1997.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun.2007.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352, 2005.

SILVA, F. de. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional ASSISTAT para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

SANTOS, L. C. DA; ZOCOLER, J.L.; BEZERRA, A. V.; CARVALHO, J.J.DE. Estudo da demanda evapotranspirométrica do município de vitória da conquista/BA., **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**. ISSN 1982-7679 (On-line) . v.5, nº. 3, p.173- 187, 2011.

SANTOS, DA S.J.; **Isolamento e Inoculação de Bactérias Diazotróficas na cultura do milho em Vitória da Conquista – BA**. Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2013.

SAMBORSKI, S.; KOZAK, M.; AZEVEDO, R. A. Does nitrogen uptake affect nitrogen uptake efficiency, or vice versa? **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 30, n. 4, p. 419-420, July 2008.

SILVA, M. F. **Avaliação da Colonização por Azospirillum ssp. Na cultura do milho (Zea Mays L.) utilizando a técnica do Elisa**. Rio de Janeiro: UFRRJ, Tese (Mestrado) Curso de Pós Graduação em Agronomia, Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 53 p., 2005.

SILVA, P. C. C.; COUTO, J. L.; SANTOS, A. R. Efeito dos íons amônio e nitrato no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. **Revista da Faculdade de zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 17, n. 1, p.104-114, 2010.

SILVA, E. F. DA.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F. DE.; MERCANTE, F. M.; RODRIGUES, E. T.; VITORINO, A. C. T. Inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada á exsudato de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. **Revista Bragantina**, v.68, p.443-451, 2009.

SOUSA, V. F. L.; OLIVEIRA, F. A. ; OLIVEIRA, F. R. A.; CAMPOS, M. S.; MEDEIROS, J. F. Efeito do Nitrato e Amônio Sobre o Crescimento da Berinjela. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.5, n.3, p. 80 - 88 julho/setembro de 2010.

SILVEIRA, E.B. 2001. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. Pp. 71-100. In: R. Barros & S.J. Michereff. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE.

STOCKDALE, E.A.; GAUNT, J.L.; VOS, J. Soil-plant nitrogen dynamics: what concepts are required? **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.7, p.145-159, 1997.

STOLLER. Disponível em:

<http://www.stoller.com.br/stoller-do-brasil/publicacoes/2011/09/03/inoculante-masterfix-gram%C3%ADneas-comprova-efici%C3%A2ncia-e-sustentabilidade>. Acesso 12 de novembro 2013.

TILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N.; PAL, K.K.; DE, R.; SAXENA, A.K.; NAUTIYAL, C. S.; MITTAL, S.; TRIPATHI, A.K.; JOHRI, B.N. Diversity of plant

growth and soil health supporting bacteria. **Current Science**, v.89, p.136-150, 2005.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, Madison v. 56, p. 105–114, 1992.

TISDALE, L.; NELSON, N.L.; BEATON, J.D.; HAVILIN, J.L. **Soil fertility and fertilizer**: Na introduction to nutriente management. 7 ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 515p.; 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. *Herbaspirillum lusttanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista - BA**. Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2012.

VON WIRÉN, N., GAZZARRINI, S., FROMMER, W.B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.196, p.191-199, 1997

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, pgs.2277-2285, 2000.

YANNI, Y.G. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 99-114, 1997.

ZAIED, K.A.; EL-HADY, A.H.; AFIFY, A.H.; NASSEF, M.A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. Pakistan. **Journal of Biological Sciences**, v.4, p.344-358, 2003.

ZIMMER, J..B; CONSALTER, R.; VARGAS, M.; CARLOS, A.; Fixação biológica de nitrogênio em poaceae. **Evidência, Joaçaba** v. 12 n. 1, p. 7-18, 2012.